

**Untersuchungen zu Mechanismen der  
glucoseselektiven Steigerung der Insulinsekretion  
durch Imidazoline**

Vom Fachbereich für Chemie und Pharmazie  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

**Claudia Bleck**

aus

**Seesen**

1. Referent: Prof. Dr. med. I. Rustenbeck

2. Referent: Prof. Dr. med. S. Lenzen

eingereicht am: 16.01.2006

mündliche Prüfung (Disputation) am: 21.03.2006

Druckjahr: 2006

## **Vorabveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs für Chemie und Pharmazie, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen:**

BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I (2004): Glucose Dependence of Imidazoline-Induced Insulin Secretion, Different Characteristics of Two ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel-Blocking Compounds. *Diabetes* 53 (Suppl. 3): S135-S139.

RUSTENBECK I, WIENBERGEN A, BLECK C, JÖRNS A (2004): Desensitization of Insulin Secretion by Depolarizing Insulin Secretagogues. *Diabetes* 53 (Suppl. 3): S140-S150.

BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I (2005): Essential role of the imidazoline moiety in the insulintropic effect but not the K<sub>ATP</sub> channel-blocking effect of imidazolines; a comparison of the effects of efaroxan and its imidazole analogue, KU14R. *Diabetologia* 48 (12): 2567-2575.

### **Tagungsbeiträge:**

BLECK C, RUSTENBECK I: A re-evaluation of the putative antagonist of imidazolines at pancreatic B-cells, KU14R. *Diabetologia* (2002), Vol. 45, Suppl.2, A167, 512. 37. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes in Budapest.

BLECK C, RUSTENBECK I: Stimulatory and Inhibitory Effects of the putative Antagonist of Insulintropic Imidazolines, KU14R; Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2003); Vol. 367, Suppl.1; R75; 286, 44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz.

BLECK C, RUSTENBECK I: The glucose-dependent insulintropic effect of efaroxan and its imidazole analogue, KU14R; *Diabetes und Stoffwechsel* 12 (2003), 75, P-15. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft in Bremen.

BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I: Efaroxan, but not RX871024 is a glucose-selective insulintropic imidazoline; *Diabetes Metab* 2003, 29, 4S79, 1595. 18. Kongress der International Diabetes Federation in Paris.

BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I: Is the imidazoline moiety necessary for the insulintropic effect of imidazolines? Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2004); Vol. 369, Suppl.1; R72; 285, 45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz.

WIENBERGEN A, BLECK C, RUSTENBECK I: Induction of oscillations of the cytosolic Calcium concentration in pancreatic islets by the imidazoline efaroxan but not by RX871024. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2004); Vol. 369, Suppl.1; R71; 283, 45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz.

BLECK C, RUSTENBECK I: Dual effect of the imidazoline analogue, KU14R, on stimulus-secretion-coupling in pancreatic beta-cells. Diabetes und Stoffwechsel 13 (2004), 53, P-114.

WIENBERGEN A, BLECK C, RUSTENBECK I: Relation between glucose dependent stimulation of insulin secretion and oscillations of the cytosolic Calcium concentration in mouse pancreatic islets. Diabetes und Stoffwechsel 13 (2004), 123, P-268.

BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I: The role of the imidazoline moiety for the insulinotropic effect of imidazolines; Diabetologia (2004), Vol. 47, Suppl.1, A155, 417, 39. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes in München.

WIENBERGEN A, BLECK C, RUSTENBECK I: The imidazoline, efaroxan acts as enhancer of nutrient-induced insulin secretion. Diabetologia (2004), Vol. 47, Suppl.1, A155, 418, 39. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes in München.

WIENBERGEN A, BLECK C, RUSTENBECK I: The glucose selective insulinotropic effect of efaroxan. Diabetologia (2005), Vol. 48, Suppl.1, A167, 450, 40. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes in Athen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2001 bis August 2005 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig angefertigt.

Es gibt viele Menschen, die auf ihre Weise einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Ihnen möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich danken, auch wenn Sie teilweise nicht namentlich erwähnt werden.

Herrn Prof. Dr. med. Ingo Rustenbeck danke ich für die Aufgabenstellung und die Betreuung der Arbeit.

Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die Zusammenarbeit; besonders Sabine Warmbold, Verena Lier-Glaubitz und Petra Weber für ihren Einsatz beim Patch-Clampen und den Sekretionsmessungen, Ines Thomsen und Gerlind Henze-Wittenberg für die Einführung in die Patch-Clamp-Technik und die Insel-Isolierung, Beate Pieper und Haide Fürstenberg für die gemeinsame Gestaltung des Cytologie-Kurses, den Mitarbeiterinnen der Zentralen Einrichtung für Tierhaltung, Sven Pape und Horst Wojan, dafür, dass Sie viele technische Anpassungen des Patch-Clamp Setups möglich machten, Dr. Nadira Friesen für die Einweisung in die neue Isolierungsmethode für Langerhans'sche Inseln, der Arbeitsgruppe von Prof. Marjan Rupnik für die Möglichkeit, die Slice Technik in ihrem Labor zu erlernen und der Medizinischen Hochschule Hannover für die Erlaubnis zur Nutzung der transfizierten HEK293-Zellen.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern, Henning und meinem Bruder Matthias bedanken, durch deren Unterstützung vieles erst erreichbar wurde.

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1      | Diabetes mellitus  | 3         |
| 1.2      | Insulinsekretion der B-Zellen des Pankreas   | 5         |
| 1.3      | Defekte der Insulinsekretion im Typ-2 Diabetes   | 10        |
| 1.4      | Etablierte Behandlungsmöglichkeiten des Typ-2 Diabetes   | 12        |
| 1.5      | Neue Therapieansätze mit insulinsekretionsteigernder Wirkung   | 14        |
| 1.5.1    | GLP-Analoga  | 14        |
| 1.5.2    | Imidazoline als Basis für die Entwicklung insulinsekretionssteigernder<br>Arzneistoffe mit glucoseselektiver Charakteristik und oraler Verfügbarkeit | 16        |
| <b>2</b> | <b>Zielsetzung und Fragestellung</b>   | <b>22</b> |
| <b>3</b> | <b>Material und Methoden</b>   | <b>23</b> |
| 3.1      | Inselisolierung und Einzelzellgewinnung  | 23        |
| 3.1.1    | Verwendete Lösungen  | 23        |
| 3.1.2    | Isolierung der Langerhans'schen Inseln und anschließende<br>Einzelzellgewinnung  | 26        |
| 3.1.3    | Anfertigung von Pankreasschnitten  | 28        |
| 3.1.4    | HEK 293-Zellen   | 29        |
| 3.2      | Perifusion   | 30        |
| 3.2.1    | Basismedium für die Perifusion   | 30        |
| 3.2.2    | Durchführung der Perifusion  | 32        |
| 3.2.3    | Reinigung des Perifusionssystems   | 33        |
| 3.2.4    | Bestimmung des Insulingehaltes   | 34        |
| 3.2.5    | Datenauswertung  | 34        |
| 3.3      | Patch-Clamp-Versuche   | 35        |
| 3.3.1    | Verwendete Lösungen und Materialien  | 35        |
| 3.3.2    | Die Patch-Clamp-Technik  | 39        |
| 3.3.3    | Durchführung und Auswertung der Messungen in der cell-attached<br>Konfiguration  | 44        |
| 3.3.4    | Durchführung und Auswertung der Messungen in der whole-cell<br>Konfiguration   | 45        |
| 3.3.5    | Durchführung und Auswertung der Messungen in der perforated-patch<br>Konfiguration   | 47        |
| 3.3.6    | Durchführung und Auswertung der elektrophysiologischen Versuche an<br>Pankreasschnitten  | 49        |
| 3.4      | Lösungen der Testsubstanzen  | 50        |
| 3.4.1    | Imidazoline und Analoga  | 50        |
| 3.4.2    | Sulfonylharnstoffe   | 51        |
| 3.4.3    | Andere Substanzklassen   | 51        |
| 3.5      | Statistik  | 52        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>53</b>  |
| 4.1      | Untersuchungen zur Glucoseselektivität von Imidazolinen der ersten Generation  | 53         |
| 4.1.1    | Konzentrationsabhängigkeit der insulinsekretionssteigernden Wirkung von Efaroxan   | 53         |
| 4.1.2    | Charakterisierung der insulinsekretionssteigernden Wirkung von RX871024 und Phentolamin                                      | 57         |
| 4.1.3    | Vergleich der Wirkungen von Efaroxan, RX871024 und Phentolamin auf die $K_{ATP}$ -Kanalaktivität in intakten B-Zellen        | 60         |
| 4.1.4    | Vergleich der Wirkungen von Efaroxan, RX871024 und Phentolamin auf das Membranpotential von B-Zellen                         | 62         |
| 4.2      | Vergleich der Wirkungen von Efaroxan und seinem Imidazol-Analogon KU14R, einem vermeintlichen Imidazolin-Antagonisten        | 65         |
| 4.2.1    | Wirkungen von Efaroxan und KU14R auf die Insulinsekretion  | 65         |
| 4.2.2    | Wirkungen von Efaroxan und KU14R auf $K_{ATP}$ -Kanäle in intakten B-Zellen  | 68         |
| 4.2.3    | Wirkungen von Efaroxan und KU14R auf das Membranpotential von B-Zellen   | 68         |
| 4.2.4    | Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Efaroxan und KU14R auf $K_{ATP}$ -Kanäle in der whole-cell-Konfiguration          | 72         |
| 4.2.5    | Hemmung der $K_{ATP}$ -Kanalaktivität in intakten B-Zellen durch 300 $\mu$ M KU14R und 300 $\mu$ M Efaroxan                  | 75         |
| 4.2.6    | Hemmung des heterolog exprimierten $K_{ir6.2\Delta C26}$ -Kanals in HEK293-Zellen durch Efaroxan und KU14R                   | 76         |
| 4.2.7    | Wirkungen von Efaroxan und KU14R auf das Membranpotential von nahezu intakten B-Zellen                                       | 78         |
| 4.2.8    | Wirkungen von KU14R auf die Insulinsekretion in einer vollständig $K_{ATP}$ -Kanal-blockierenden Konzentration               | 80         |
| 4.3      | Einfluss des Energiestoffwechsels auf die Wirkung der Imidazoline  | 82         |
| 4.3.1    | Einfluss der Blockade der Atmungskette durch Natriumcyanid auf die $K_{ATP}$ -Kanal-blockierende Wirkung der Imidazoline     | 82         |
| 4.4      | Messungen des Membranpotentials an B-Zellen im Zellverband der Langerhans'schen Inseln und Wirkung von Efaroxan              | 85         |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>  | <b>90</b>  |
| 5.1      | Untersuchungen zur Glucoseselektivität der Imidazoline der ersten Generation   | 90         |
| 5.2      | Vergleich der Wirkungen von Efaroxan und seinem Imidazol-Analogon KU14R, einem vermeintlichen Imidazolin-Antagonisten        | 94         |
| 5.3      | Konsequenzen der Hemmung des Energiestoffwechsels der B-Zellen für den Imidazolin-induzierten Schluss von $K_{ATP}$ -Kanälen | 101        |
| 5.4      | Messungen des Membranpotentials an B-Zellen im Zellverband der Langerhans'schen Insel und die Wirkung von Efaroxan           | 105        |
| <b>6</b> | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>110</b> |
| <b>7</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>  | <b>113</b> |
| <b>8</b> | <b>Abkürzungen</b>   | <b>126</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Diabetes mellitus

Das Krankheitsbild des Diabetes mellitus stellt eine komplexe Regulationsstörung des Stoffwechsels dar. Im Vordergrund steht eine chronische Hyperglykämie, die häufig zusammen mit Dyslipidämie, Adipositas und Hypertonie auftritt. Ein Diabetes mellitus liegt nach Kriterien der American Diabetes Association (ADA) vor, wenn die venöse Plasmaglukosekonzentration nüchtern Werte über 126 mg/dl (7,0 mmol/l) annimmt, oder wenn sie 2 Stunden nach peroraler Einnahme von 75 g Glucose mehr als 200 mg/dl (11,1 mmol/l) beträgt (EXPERT COMMITTEE, 2003). Ätiologisch wird der Diabetes mellitus in die in Tabelle 1 genannten Typen unterteilt (ALBERTI und ZIMMET, 1998; EXPERT COMMITTEE, 2003).

|   |
|---|
| <b>I. Typ1 Diabetes</b><br>(B-Zell-Zerstörung, die üblicherweise zum absoluten Insulinmangel führt)<br>A. Immunologisch vermittelt<br>B. Idiopathisch   |
| <b>II. Typ 2 Diabetes</b><br>(kann sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken)  |
| <b>III. Andere spezifische Diabetes Typen</b><br>A. Genetische Defekte der B-Zell-Funktion<br>B. Genetische Defekte der Insulinwirkung<br>C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas<br>D. Endokrinopathien<br>E. Medikamenten- oder chemikalieninduziert<br>F. Infektionen<br>G. Seltene Formen des immunvermittelten Diabetes<br>H. Andere, gelegentlich mit Diabetes assoziierte genetische Syndrome |
| <b>IV. Gestationsdiabetes</b>   |

**Tabelle 1.1:** Einteilung des Diabetes mellitus (nach: ALBERTI und ZIMMET, 1998; EXPERT COMMITTEE, 2003)



In Deutschland sind 7 – 8 % aller Erwachsenen an Diabetes erkrankt (einschließlich der nicht diagnostizierten Fälle; HAUNER, 1998; JANKA et al, 2000).

Lange Zeit war der Typ 1 Diabetes die vorherrschende Form des Diabetes. Beim Typ 1 Diabetes kommt es zur Zerstörung der insulinproduzierenden B-Zellen des Pankreas. Dieses ist meistens immunologisch vermittelt und bewirkt einen absoluten Insulinmangel (Praxis-Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG), 2002). Ungefähr 5 % aller Diabetes-Patienten in Deutschland leiden an einem Typ 1 Diabetes (JANKA et al, 2000).

Mittlerweile stellt der Typ 2 Diabetes weltweit die häufigste Diabetesform dar. Im Jahr 2000 waren insgesamt 151 Millionen Menschen an Typ 2 Diabetes erkrankt und es wird geschätzt, dass diese Zahl bis zum Jahr 2025 auf 300 Millionen ansteigen wird (ZIMMET et al., 2001).

80 – 90 % der Patienten mit Typ 2 Diabetes sind übergewichtig und zeigen eine verminderte Ansprechbarkeit des Gewebes auf Insulin (sogenannte Insulinresistenz; BODEN, 1997). Die Insulinresistenz führt jedoch nur dann zu einem Typ 2 Diabetes, wenn gleichzeitig eine gestörte Insulinsekretion vorliegt, so dass die Insulinresistenz nicht durch eine gesteigerte Insulinsekretion kompensiert werden kann (CAHILL, 1988; FERANNINI, 1998; GERICH, 1998).

Die bei diesem Krankheitsbild vorliegende chronische Hyperglykämie kann diabetesspezifische Mikroangiopathien hervorrufen (JANKA et al., 2000). Unter dem Begriff Mikroangiopathien werden Schäden an den kleinen Blutgefäßen, den Blutkapillaren, zusammengefasst. Diese Blutkapillaren versorgen unter anderem die Netzhaut des Auges (Retina), die Niere und Neuronen mit Nährstoffen. Schädigungen dieser Kapillaren z. B. infolge einer Glykosilierung des Endothels durch erhöhte Blutglucosekonzentrationen, können zu Retinopathien mit Erblindung, Nierenversagen mit Dialysepflichtigkeit und Neuropathien führen. Durch Neuropathien kann die Tastsensibilität stark reduziert werden. Die schlimmste Folge einer unzureichenden Tastsensibilität stellt die Entwicklung eines sogenannten diabetischen Fußes dar. Darunter werden offene Verletzungen an den Füßen der Patienten mit Diabetes zusammengefasst. Diese Verletzungen bilden sich auf Grund der verminderten Wundheilung der Betroffenen nur selten zurück. Bei ausbleibender Behandlung kann ein diabetischer Fuß eine Amputationen dieses Körperteiles notwendig machen (BOULTON, 2000; HELLER et al., 2004).

Schäden an den großen Blutgefäßen wie den Arterien werden als Makroangiopathien bezeichnet. Makroangiopathien werden hauptsächlich durch Atherosklerose ausgelöst. Durch eine diabetische Stoffwechsellage wird das Auftreten atherosklerotischer Veränderungen und den damit verbundenen Folgeerkrankungen, die vorwiegend an Herz, Gehirn und den

peripheren Arterien auftreten, begünstigt. Dieses kann u. a. zu Herzinfarkt und Schlaganfall führen (JANKA et al., 2000).

Die Mikro- und Makroangiopathien werden als Spätschäden eines Diabetes bezeichnet. Diese senken die Lebensqualität und auch die Lebenserwartung der Betroffenen.

Patienten mit Typ 2 Diabetes versterben mittlerweile nicht mehr an diabetischem Koma oder Hypoglykämien sondern an den kardiovaskulären Erkrankungen (JANKA et al., 2000). Deswegen sollte eine Therapie zusätzlich zur Korrektur des Blutzuckerspiegels wenn notwendig auch den Fettstoffwechsel und den Blutdruck der Patienten verbessern (GEORGE und ALBERTI; 2001). Ziele der Therapie des Typ 2 Diabetes ist es, die Lebensqualität der Patienten zu erhalten oder wiederherzustellen, akute Stoffwechselkomplikationen wie z.B. das diabetische Koma und Hypoglykämien zu vermeiden, die Entstehung von Spätschäden hinauszuzögern, eintretende Komplikationen zu therapieren und Risikofaktoren wie Hypertonie und Dyslipidämie zu senken (BERGER, 1990; Praxis-Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG), 2002). Zu beachten ist, dass die Therapie eines Diabetes individuell auf die Lebenssituation des Patienten angepasst werden muss. So sollten z. B. die Begleiterkrankungen, das Lebensalter und die Lebenserwartung bei der Therapieplanung berücksichtigt werden (HÄRING und MATTHAI, 2002).

### **1.2 Insulinsekretion der B-Zellen des Pankreas**

Streng genommen wird die Insulinsekretion *in vivo* ausschließlich durch Nährstoffe ausgelöst. Unter physiologischen Bedingungen stellt die Erhöhung der Blutglucosekonzentration für die B-Zellen des Pankreas den wichtigsten Reiz zur Ausschüttung des Peptidhormons Insulin dar. Moduliert wird die Insulinsekretion durch einige gastrointestinale Hormone wie z.B. GIP (glucose-dependent insulin-releasing peptide, früher gastric inhibitory peptide) und GLP 1 (glucagon like peptide) (CREUTZFELDT, 2001) und durch das vegetative Nervensystem (ASHCROFT und RORSMAN, 1989). Die Aktivierung von m-Cholinozeptoren (SAMOLS und WEIR, 1979) steigert die Sekretion, wohingegen eine Aktivierung von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren (ROBERTSON und PORTE, 1973; SAMOLS UND WEIR, 1979) die Insulinsekretion hemmt.

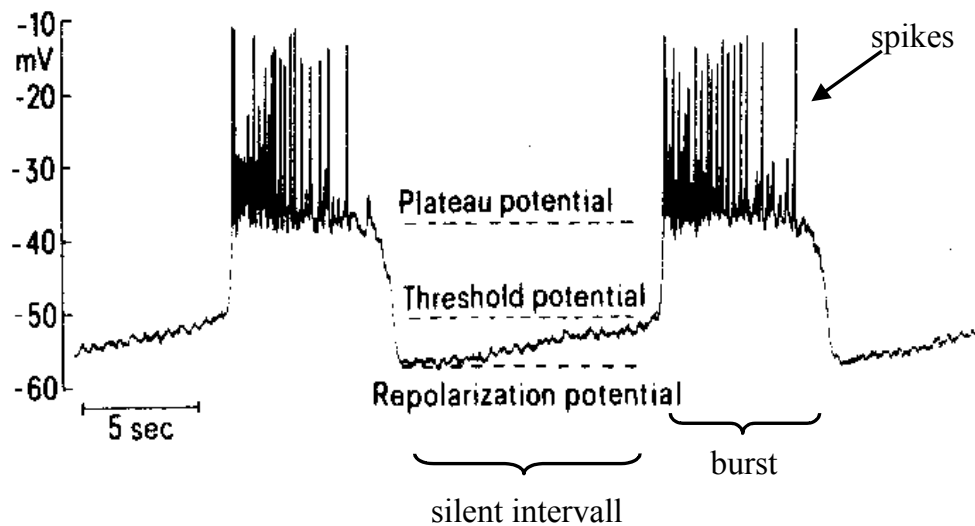
Eine Erhöhung der Glucose-Konzentration im Blut führt zu einer Erhöhung der Insulinsekretion. Die Beziehung zwischen Glucoseerhöhung und Insulinsekretion verläuft sigmoidal (TURNER et al., 1979) mit der größten Steigung zwischen 6 und 12 mmol/l bei Menschen (BYRNE et al., 1996) und zwischen 8 und 17 mmol/l bei Albinomäusen (LENZEN, 1979).

Vorraussetzung für die glucoseinduzierte Steigerung der Insulinsekretion ist die Verstoffwechselung der Glucose (COORE und RANDLE, 1964; ASHCROFT und RANDLE, 1968). Diese Erkenntnis wird auch als „Nährstoff-Hypothese“ bezeichnet (MALAISSE et al., 1979; NEWGARD und MCGARRY, 1995).

Durch den Glucosetransporter GLUT2, der in hoher Dichte in der Zellmembran der B-Zellen des Pankreas lokalisiert ist (SCHUIT et al., 2001), wird vermehrt Glucose in das Cytosol aufgenommen. Durch Glucokinase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glykolyse (GERMAN, 1993; MATSCHINSKY, 1996), wird der Glucoseabbau gestartet. Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, wird in den Matrixraum der Mitochondrien transportiert, zu Acetyl-CoA umgesetzt und im Citratcyclus zu  $\text{CO}_2$  abgebaut. Durch Reaktionen des Citratcyclus werden Nucleotide wie NADH und FADH gebildet. Diese Nucleotide bewirken an der inneren Mitochondrienmembran den Aufbau eines Protonengradienten (MATSCHINSKY, 1996). Dieser Gradient stellt die Voraussetzung für die nachfolgende oxidative Phosphorylierung dar. In dieser wird der aufgebaute Protonengradient durch das Enzym ATP-Synthase zur ATP-Bildung bei gleichzeitiger Reduktion von Sauerstoff zu Wasser genutzt. Ein Ergebnis des gesteigerten Stoffwechsels ist ein Anstieg des ATP- und eine Reduktion des ADP-Gehalts und damit eine Steigerung der sogenannten ATP/ADP-Ratio im Cytosol der B-Zellen (MEGLASSON et al., 1989; GHOSH et al., 1991; HENQUIN et al., 1994; PRENTKI, 1996).

Die gesteigerte ATP-Konzentration in den Zellen führt zu einer Blockade des ATP-empfindlichen Kaliumkanals ( $K_{\text{ATP}}$ -Kanal) in der Plasmamembran der B-Zellen. Dieser Kanal setzt sich aus jeweils 4 Sulfonylharnstoffrezeptoren vom Typ 1 (SUR1) und 4 porenbildenden Untereinheiten ( $K_{\text{ir}6.2}$ ) zusammen. Der  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal stellt einen einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal dar ( $K_{\text{ir}}$  = Kalium *inward* *rectifying*) (NICHOLS und LOPATIN, 1997). Dieses bedeutet, dass er unter *in vitro* Bedingungen die Kalium-Ionen bevorzugt in das Zellinnere leitet. *In vivo* allerdings erfolgt der Kaliumstrom entsprechend dem Konzentrationsgefälle (140 mM cytosolisch, 5 mM extrazellulär) vom Cytosol in den extrazellulären Raum (RORSMAN und TRUBE, 1985). Durch Bindung von ATP an eine intrazellulär gelegene Struktur des Kaliumkanals am SUR1 (BRYAN, 1999) wird die Pore des Kanals geschlossen und damit der Kaliumstrom verringert. Anschließend kommt es durch einen bis jetzt noch nicht näher identifizierten Einwärtsstrom zur Depolarisation der Plasmamembran der B-Zelle (ASHCROFT und RORSMAN, 1989; DUNNE et al., 1994; ATWATER et al., 1996). Depolarisation bedeutet, dass die über der Plasmamembran aufgebaute Spannung von einem Ruhewert um  $-70 \text{ mV}$  auf Werte um  $-40 \text{ mV}$  ansteigt.

Die durch Glucose ausgelöste Depolarisation der B-Zellen zeigt oszillierendes Verhalten (HENQUIN und MEISSNER, 1984). Es erfolgt Depolarisation bis zu einem Schwellenwert um  $-40$  mV. Ausgehend von diesem Schwellenwert werden Aktionspotentiale ausgelöst. Diese Phase wird als „burst“ bezeichnet. An einen „burst“ schließt sich eine Phase mit einem Membranpotential unterhalb des Schwellenwertes an, welche „silent intervall“ genannt wird (DUNNE et al., 1994). Der Wechsel zwischen „burst“ und „silent intervall“ wird auch unter der Bezeichnung „slow waves“ oder „Oszillationen des Membranpotentials“ zusammengefasst (s. Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1** Darstellung der „slow waves“ des Membranpotentials mit dem typischen „spike“ und „burst“ Muster. Verändert nach HENQUIN und MEISTER, 1984.

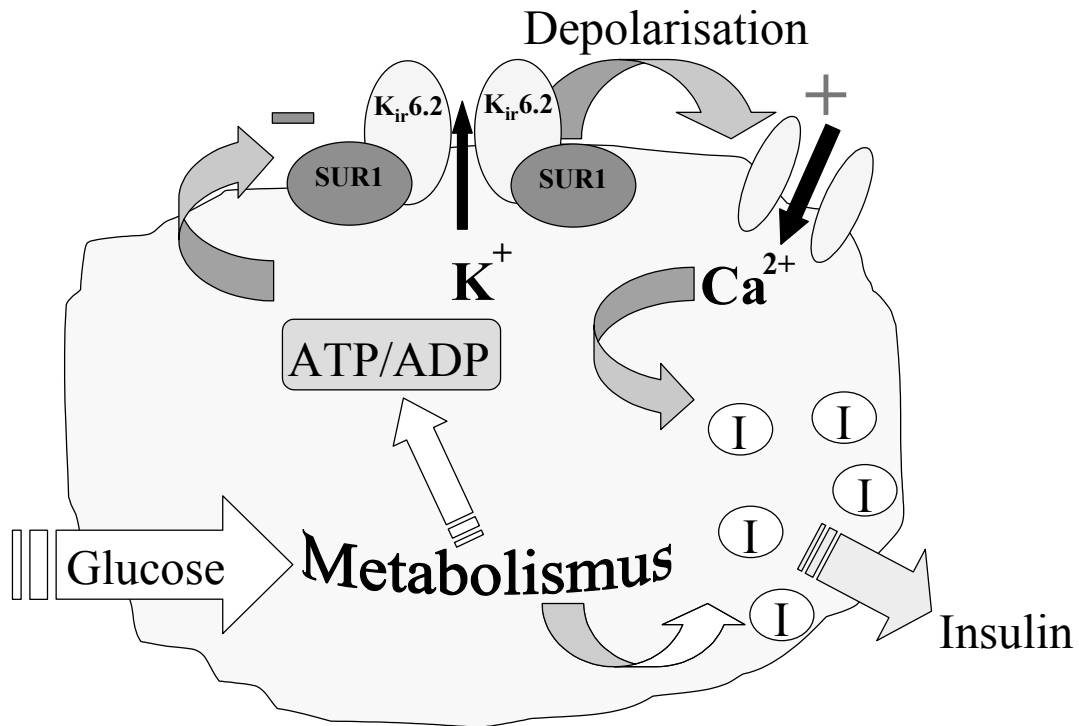
Zur Zeit wird diskutiert, inwieweit sich die elektrischen Eigenschaften isolierter B-Zellen von den elektrischen Eigenschaften der B-Zellen innerhalb des Zellverbands der Insel unterscheiden (ATWATER et al., 1996; SPEIER, 2004; SPEIER et al, 2005). Zum Beispiel sollen nur B-Zellen innerhalb der Langerhans'schen Insel oder in Clustern von mindestens 4 Zellen bei Erhöhung der Glukosekonzentration von 0 mM auf z.B. 11 mM den typischen Wechsel zwischen „bursts“ und „silent intervall“ im Membranpotential zeigen. Oszillationen in einzelnen B-Zellen werden nur selten beobachtet (ATWATER et al., 1996; SMITH et al.,

1990). Auf Grund dieser Beobachtungen wurden für das oszillierende Verhalten unter anderem Zell-Zell Interaktionen, wie Kopplung über Gap-Junctions, verantwortlich gemacht (MEARS et al., 1995; ANDREU et al., 1997; ATWATER et al., 1996).

Die während der Depolarisation auftretenden Aktionspotentiale werden der Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle (L-Typ Calcium-Kanäle) zugeschrieben (RORSMAN et al., 1988, DUNNE et al., 1994). Dieses führt zu einem Anstieg der Calcium-Konzentration in der Nähe der Cytoplasmamembran (ÄMMÄLÄ et al., 1993). Die gesteigerte Calcium-Konzentration stellt für die B-Zellen ein Signal zur Auslösung der Insulinexocytose dar (MATTHEWS, 1970) (s. Abbildung 1.2).

Allerdings scheint ein Anstieg der Calcium-Konzentration nicht das einzige Signal für die Insulinausschüttung zu sein (ZAITSEV et al., 1995; DUNNE et al., 1994). Durch Glucose und einige andere Nährstoffe wie D-Glyceraldehyd und  $\alpha$ -Ketoisocapronat (KIC) sollen noch weitere Signale in der B-Zelle erzeugt werden, die eine Verstärkung der Insulinsekretion bewirken (PANTEN et al., 1988; GEMBAL et al., 1992; STRAUB und SHARP, 2002). Die Arbeitsgruppe um Panten belegte diesen Effekt durch Experimente, in denen isolierte Maus-Inseln mit auf  $K_{ATP}$ -Kanäle maximal wirksamen Sulfonylharnstoff-Konzentrationen perfundiert wurden. Durch eine Erhöhung der Glucosekonzentration konnte die Insulinsekretion bei komplett geschlossenen  $K_{ATP}$ -Kanälen über die allein durch Sulfonylharnstoffe ausgelöste Sekretionsrate hinaus gesteigert werden. Diese Eigenschaft wurde auch für D-Glyceraldehyd und  $\alpha$ -Ketoisocapronat (KIC) (PANTEN et al., 1988) gezeigt. Die Gruppe um Henquin publizierte 1992, dass statisch inkubierte Inseln, deren  $K_{ATP}$ -Kanäle durch Diazoxid geöffnet waren und die durch hohe extrazelluläre Kalium-Konzentrationen depolarisiert wurden, bei Erhöhung der Glucosekonzentration mit einer Steigerung der Insulinsekretion reagierten (GEMBAL et al., 1992). Sie zeigten dabei auch, dass für den verstärkenden Effekt eine Verstoffwechselung der Nährstoffe und ein Anstieg der cytosolischen Calcium-Konzentration notwendige Voraussetzungen sind.

Daher wird vom „*triggering*“, also auslösenden, und „*amplifying*“ also verstärkenden Signalweg gesprochen (HENQUIN, 2000). Der „*triggering pathway*“ bezeichnet die Signalkaskade, die mit dem Schluss des  $K_{ATP}$ -Kanals beginnt. Hingegen ist der „*amplifying pathway*“ zur Zeit in seinem Ablauf noch nicht charakterisiert. Seine Aufklärung wäre sehr bedeutsam, da dann Pharmaka entwickelt werden könnten, die selektiv Strukturen des verstärkenden Signalwegs angreifen und so beim Typ 2 Diabetes eingesetzt werden könnten ohne ein Hypoglykämierisiko zu besitzen, da sie die Insulinsekretion nur bei erhöhten Glucosekonzentrationen steigern würden.



**Abbildung 1.2** Schema der Konsensus-Hypothese der Stimulus-Sekretions-Kopplung in der B-Zelle des Pankreas. Die Steigerung des Energiestoffwechsels durch die Aufnahme und Metabolisierung von Glucose führt zum Anstieg des ATP/ADP-Konzentrationsverhältnisses im Cytosol. Dieses bewirkt den Schluss der  $K_{ATP}$ -Kanäle und führt zu einer Depolarisierung der Plasmamembran. Die Depolarisation führt zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle (VDCC) und es kommt zum vermehrten Einstrom von  $Ca^{2+}$  in das Cytosol. Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) ist das unmittelbare Signal für die Freisetzung von Insulin. – steht für eine Hemmung der gekennzeichneten Struktur, + steht für eine Aktivierung derselben.

### 1.3 Defekte der Insulinsekretion im Typ-2 Diabetes

Beim Typ 2 Diabetes reicht die sezernierte Insulinmenge nicht aus, um den Blutglucosespiegel ausreichend zu senken, obwohl sie zu Beginn größer als bei nicht diabetischer Probanden ist. Ursache hierfür können ein vermindertes Ansprechen des peripheren Gewebes auf Insulin, welches als Insulinresistenz bezeichnet wird, oder Störungen im Bereich der Insulinsekretion sein. Insulinresistenz scheint aber nur dann zu einem Typ 2 Diabetes zu führen, wenn gleichzeitig eine gestörte Insulinsekretion vorliegt (CAHILL, 1988; FERANNINI, 1998; GERICH, 1998).

Unter physiologischen Bedingungen wird Insulin *in vitro* und *in vivo* auf einen Glucosereiz in zwei Phasen sezerniert (GRODSKY, 1996; PRATLEY und WEYER, 2001).

*In vitro* ist die Reaktion isolierter Pankreas-Inseln auf eine stufenartige Erhöhung der Glucosekonzentration durch einen schnellen Anstieg der Insulinsekretion und nachfolgendem Absinken auf Werte, die der Basalsekretion entsprechen, charakterisiert. Dieses wird als erste Phase der Insulinsekretion bezeichnet. Anhaltende Glucose-Exposition leitet eine sich anschließende, langsamere zweite Phase mit gegenüber Basalwerten erhöhter Insulinsekretion ein. Diese kann über mehrere Stunden aufrecht erhalten werden (GRODSKY, 1996). Bei weiter anhaltender Glucoseexposition ist die Insulinsekretion auf einem niedrigeren Level registrierbar. Diese dritte Phase wird auch als Desensitisierungsphase der Insulinsekretion bezeichnet (GRODSKY, 1996).

*In vivo* ist das Muster der einzelnen Phasen der Insulinsekretion sichtbar im hyperglykämischen Clamp (DE FRONZO et al., 1979; PRATLEY et al., 2000) und unter einer intravenösen Glucosebelastung (LILLIOJA et al., 1993). Das Maximum der ersten Phase der Insulinsekretion wird *in vivo* innerhalb von 5 bis 10 Minuten nach Beginn einer Glucose-Infusion erreicht (PRATLEY und WEYER, 2001). Anhaltende Glucose-Infusion führt auch hier zu einer zweiten Phase der Insulinsekretion, die wiederum über mehrere Stunden aufrecht erhalten werden kann.

Nach oraler Belastung mit Glucose ist keine klare Trennung zwischen erster und zweiter Phase möglich, da die Geschwindigkeit der Magenentleerung und gastrointestinale Hormone die Antwort auf eine orale Glucosebelastung beeinflussen. In diesem Fall spricht die Arbeitsgruppe um Weyer bei der Insulinsekretion innerhalb der ersten 30 Minuten nach oraler Glucosegabe von der frühen Insulinantwort und bezeichnet die Sekretion zwischen Minute 60 und Minute 120 als späte Insulinantwort (PRATLEY und WEYER, 2001).

Bei Patienten mit gestörter Glucosetoleranz (impaired Glucose tolerance = IGT) und im frühen Stadium des Typ 2 Diabetes ist die erste Phase der Sekretion nach einem Glucosereiz

oft erniedrigt und die zweite Phase stark erhöht, so dass im Intergral eine Hyperinsulinämie vorliegt (CERASI und LUFT, 1967; DAVIES et al., 1993). Eine erniedrigte erste Phase der Sekretion wurde als ein von der Insulinresistenz unabhängiger Risikofaktor identifiziert, mit dem die Wahrscheinlichkeit, einen Diabetes zu entwickeln, angegeben werden kann (WEYER et al., 2001).

Für erhöhte Blutglucosespiegel nach einer Mahlzeit können, neben einer veränderten Insulinsekretion, auch mehrere andere Faktoren, wie z.B. fehlendes Absinken der endogene Glucoseproduktion und ungenügende Unterdrückung der Glucagonsekretion im Plasma während der Mahlzeiten verantwortlich gemacht werden (DEL PRATO und TIENGO, 2001). Obwohl diese Faktoren unabhängig voneinander die endogene Glucoseproduktion beeinflussen können, ist es möglich, dass sie alle auf eine Verminderung der ersten Phase der Insulinsekretion zurückzuführen sind.

Da für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes wahrscheinlich Störungen der Insulinsekretion pathogenetisch bedeutsam sind und durch Wiederherstellung des physiologischen Musters der Insulinsekretion eine verbesserte Glucosetoleranz erreicht werden kann, stellen Pharmaka mit insulinsekretionssteigernder Wirkung einen rationalen Therapieansatz dar.



#### 1.4 Etablierte Behandlungsmöglichkeiten des Typ-2 Diabetes

Mit einer pharmakologischen Beeinflussung der Stoffwechsellage eines Typ 2 Diabetikers wird erst dann begonnen, wenn durch nicht pharmakologische Maßnahmen wie Ernährungsumstellung und vermehrte Bewegung die Therapieziele innerhalb von drei Monaten nicht erreicht werden.

Die Therapieziele bestehen u.a. in einer Reduktion des HbA<sub>1C</sub>-Wertes auf  $\leq 6,5\%$ , einer Reduktion der Blutzuckerwerte nüchtern und präprandial auf 80 – 120 mg/dl (4,4 – 6,7 mmol/l) und des Gesamt-Cholesterins auf Werte unter 180 mg/dl ( $< 4,7$  mmol/l) (HÄRING und MATTHAI, 2002).

Bei der pharmakologischen Behandlung des Typ 2 Diabetes stehen zur Zeit neben der subkutanen Insulin-Therapie, die zur Zeit erst begonnen wird, wenn durch den Einsatz oraler Antidiabetika die Therapieziele nicht erreicht werden, Arzneistoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zur Verfügung.

Das Biguanid-Derivat Metformin wird hauptsächlich bei übergewichtigen Typ 2 Diabetikern eingesetzt. Metformin senkt den Blutglukosespiegel vorwiegend durch Hemmung der hepatischen Gluconeogenese (WOLLEN und BAILEY, 1988 a und b) und Steigerung der Glucoseaufnahme in Fettgewebe und Skelettmuskel (MATTHAEI et al., 1992).

Für die Behandlung normalgewichtiger Typ 2 Diabetiker werden überwiegend Sulfonylharnstoffe verwendet (HÄRING und MATTHAI, 2002). Der Wirkmechanismus der Sulfonylharnstoffe besteht darin, dass sie K<sub>ATP</sub>-Kanäle schließen und damit den Signalweg über Depolarisation der B-Zellen und Calciumerhöhung bis zur Insulinsekretion in Gang setzen. Dieses erfolgt schon bei basalen Blutglukosespiegeln. Daher können Sulfonylharnstoffe eine unter Umständen lebensbedrohliche Hypoglykämie auslösen.

Weiterhin stehen als Pharmaka mit insulinsekretionssteigernder Wirkung die Sulfonylharnstoff-Analoga Repaglinid und Nateglinid zur Verfügung. Sie sollen gegenüber den Sulfonylharnstoffen den Vorteil eines schnelleren Wirkungseintritt besitzen, dadurch eine mahlzeitnahe Applikation erlauben und besonders die postprandialen Blutzuckerspiegel absenken (NORMAN und RABASEDA, 2001; PRATLEY et al, 2001).

Als weitere Therapieoption stehen Thiazolidindione mit den Vertretern Rosiglitazon und Pioglitazon zur Verfügung. Diese vermindern durch Angriff an den PPAR $\gamma$ -Rezeptor und einer damit verbundenen Beeinflussung der Genexpression die Insulinresistenz der peripheren Gewebe (MUDALIAR und HENRY, 2001; STUMVOLL und HÄRING, 2002). In der Therapie führen diese PPAR $\gamma$ -Rezeptor Agonisten aber häufig zu Gewichtszunahmen (MUDALIAR und HENRY, 2001; STUMVOLL und HÄRING, 2002).

Um besonders die postprandialen Hyperglykämien zu senken, können alpha-Glukosidasehemmer wie z.B. Acarbose eingesetzt werden. Durch Hemmung der alpha-Glukosidasen im Dünndarm wird die Resorption von Glukose verzögert.

Alle zur Zeit in der Therapie eingesetzten oralen Antidiabetika verlieren im Verlauf der Behandlung an Wirksamkeit, so dass auch Typ 2 Diabetiker von einem bestimmten Zeitpunkt an mit Insulin behandelt werden müssen (KARAM et al., 1986; KAWAKI et al., 1999; TURNER et al., 1999).

## **1.5 Neue Therapieansätze mit insulinsekretionsteigernder Wirkung**

Ziel der Entwicklung neuer Antidiabetika ist eine Wiederherstellung des physiologischen Sekretionsmusters bei einer Glucosebelastung ohne das Risiko einer überschießenden Wirkung. Das Risiko einer überschießenden Wirkung besteht im Auslösen einer unter Umständen lebensbedrohlichen Hypoglykämie. Substanzen, die nur bei erhöhten Glucosekonzentrationen die Insulinsekretion steigern, gelten als glucoseselektiv. Sie werden auch Potentioren der Insulinsekretion genannt und stehen damit den Substanzen gegenüber, die schon bei basalen Glucosekonzentration die Insulinsekretion steigern und deswegen als Initiatoren der Insulinsekretion bezeichnet werden (ASHCROFT und RORSMAN, 1989).

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt eine glucoseselektive Steigerung der Sekretion durch Acetylcholin, Glucagon, GLP 1 (glucagon like peptide 1), GIP (glucose-dependent insulin-releasing peptide früher gastric inhibitory peptide) und VIP (vasoactive intestinal peptide). Zu den synthetisch entwickelten Substanzen mit Glucoseselektivität gehören vor allem GLP 1-Analoga und einige Imidazoline.

### **1.5.1 GLP-Analoga**

GLP 1 ist ein Peptid aus 30 Aminosäuren und seine Aminosäuresequenz ist zu 50 % identisch mit der Aminosäuresequenz des Glucagons (AHRÉN, 1998). Es wird als Hormon von L-Zellen des distalen Ileums und des Colons gebildet und während der Nahrungsaufnahme in das Blut abgegeben (CREUTZFELDT, 2001). An den B-Zellen des Pankreas bewirkt es eine Steigerung der Insulinsekretion bei gegenüber Basalwerten erhöhten Glucosekonzentrationen (AHRÉN, 1998, MacDONALD et al., 2002a).

GLP 1 soll seine insulinsekretionssteigernde Wirkungen durch Bindung an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor ausüben (AHRÉN, 1998). Dadurch wird die Aktivität der Adenylatcyclase gesteigert mit nachfolgendem Anstieg des cAMP-Gehalts und Zunahme der Aktivität von Proteinkinase A (PKA). Die gesteigerte PKA Aktivität soll weitere Signale wie veränderte Ionen-Kanal-Aktivität, veränderte Behandlung und Verteilung des intrazellulären Calciums und eine gesteigerte Exocytoserate der Insulin enthaltenden Granula auslösen (HOLST, 2002). Zusätzlich zu einer Steigerung der Insulinsekretion verstärkt GLP 1 die Insulinsynthese, die Insulin-Gen-Expression und die Expression der Gene für das Enzym Glucokinase und den Glucosetransporter GLUT2. Außerdem senkt es die Apoptose, steigert die Mitose in B-Zellen und hemmt die Glucagonsekretion, den Appetit und die Nahrungsaufnahme (VILSBØLL und HOLST, 2004).

GLP 1 ist nur kurz wirksam, da es sehr schnell durch Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) abgebaut wird. Seine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) beträgt 1,5 bis 2 min (AHRÉN, 1998; HOLST und DEACON, 1998).

Um die GLP 1-Wirkungen therapeutisch nutzen zu können, gibt es folgende Entwicklungen:

1.) Die Synthese von GLP 1-Analoga, die resistent gegenüber dem Abbau durch Dipeptidylpeptidase IV sind (GALLWITZ et al., 2000; MEIER et al., 2003), 2.) Hemmung der Dipeptidylpeptidase IV (= DPP IV) (WIEDEMANN und TREVILLYAN, 2003) und 3.) die kontinuierliche Gabe von GLP 1 über Pumpen (MEIER et al., 2003).

Zu der ersten Gruppe gehört die Substanz Exendin-4 (YOUNG et al., 1999; NIELSEN et al., 2004). Dieses Peptid besitzt eine zu 53 % mit dem humanen GLP 1 identische Aminosäuresequenz (YOUNG et al., 1999). Es wurde aus der Eidechse *Heloderma suspectum* (synonym: *Gila monster*) isoliert.

Bei Hemmung der Dipeptidylpeptidase IV, welches als zweite Entwicklungsrichtung verfolgt wird, ist zu beachten, dass diese nicht ausschließlich für den Abbau von GLP 1 verantwortlich ist, sondern wahrscheinlich noch andere Angriffspunkte im Organismus besitzt. Das Nebenwirkungspotential von DPP IV-Hemmstoffen ist daher noch nicht überschaubar (DRUCKER, 2003). Zum Teil wird auch postuliert, dass keine Nebenwirkungen beim Einsatz der DPP IV-Hemmstoffe auftreten. Die Sicherheit dieses Therapieansatzes soll dadurch gestützt werden, dass Mäuse, bei denen das Gen für DPP IV ausgeschaltet wurde, außer einer erhöhten Glucose Toleranz keine weiteren Funktionsstörungen aufweisen (HOLST, 2002).

Eine kontinuierliche GLP 1 Administration, die bei der dritten Entwicklungsrichtung zum Einsatz käme, würde das Tragen von Pumpen voraussetzen. Da dieses nicht patientenfreundlich ist, scheint das Prinzip der langwirksamen GLP 1-Analoga mit Exendin-4 als erfolgsversprechendsten Vertreter dieser Substanzklasse am zukunftsträchtigsten zu sein.

Eine Nebenwirkung der GLP 1-Analoga ist das Auslösen von Übelkeit. Diese Nebenwirkung soll aber nur oberhalb der klinisch relevanten Konzentrationsbereiche auftreten (AHRÉN, 1998; HOLST, 2002).

In der Anwendung stellt es sich als Nachteil dar, dass nicht nur GLP 1 sondern auch die Analoga als Peptide injiziert werden müssen. Daher ist zu erwarten, dass die Patienten vergleichbar mit der Insulinsubstitution auch gegenüber der Gabe von GLP 1-Analoga eine niedrige Compliance aufbringen werden.

Deswegen ist es weiterhin sehr wichtig und notwendig Stoffe mit GLP 1 artiger, also glucoseselektiver Wirkung, aber mit oraler Verfügbarkeit zu entwickeln. Einige Vertreter aus der Substanzklasse der Imidazoline scheinen das Potential für diese Entwicklung zu besitzen.

### **1.5.2 Imidazoline als Basis für die Entwicklung insulinsekretionssteigernder Arzneistoffe mit glucoseselektiver Charakteristik und oraler Verfügbarkeit**

Das erste Imidazolin für welches eine glucoseselektive Steigerung der Insulinsekretion beschrieben wurde ist RX871024 (ZAITSEV et al., 1996). Zaitsev und Mitarbeiter zeigten, dass RX871024 in Konzentrationen von 5 und 10  $\mu\text{M}$  die Insulinsekretion bei statisch inkubierten und perifundierten Ratten-Inseln in Gegenwart von 16,7 mM Glucose steigerte, dagegen in Gegenwart von 3,3 mM Glucose die Insulinsekretion unbeeinflusst ließ. Allerdings verlor die Substanz bei Konzentrationen über 10  $\mu\text{M}$  ihre Glucoseselektivität. Auch für das Imidazolin Efaroxan wurde eine glucoseselektive Steigerung der Insulinsekretion postuliert (CHAN und MORGAN, 1990).

Die Entwicklung der Imidazoline als Substanzen mit insulinsekretionssteigernder Wirkung geht auf die Beobachtung zurück, dass  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Antagonisten wie zum Beispiel Phentolamin die Blutglucosekonzentration senken konnten (ROBERTSON und PORTE, 1973; EFENDIC et al., 1975). Allerdings zeigten Schulz und Hasselblatt 1988, dass die Senkung der Blutglucosekonzentration nicht an den  $\alpha_2$ -Antagonismus, sondern an das Vorhandensein einer Imidazolinstruktur gebunden war (SCHULZ und HASSELBLATT, 1988, 1989a und b).

Daraufhin begann die Suche nach dem insulinsekretionssteigernden Wirkmechanismus der Imidazoline. Nachdem verschiedene Imidazolin-Rezeptoren, wie z.B.  $I_1$ -Rezeptoren im Hirnstamm, in der Niere und Thrombozyten verschiedener Spezies wie Mensch, Ratte und Meerschweinchen sowie  $I_2$ -Rezeptoren in peripherem Gewebe und Hirngewebe von Säugern nachgewiesen wurden (zur Übersicht s. MOLDERINGS, 1997), erschien es denkbar, dass auch die blutzuckersenkende Wirkung durch einen Imidazolin-Rezeptor ( $I_3$ -Rezeptor) vermittelt wird. Die ursprüngliche Hypothese zum insulinsekretionssteigernden Wirkmechanismus der Imidazoline lässt sich daher so formulieren, dass über einen membranständigen Rezeptor eine Vielzahl von Wirkungen an der B-Zelle ausgelöst werden, von denen eine der Schluss des  $K_{ATP}$ -Kanals ist. Für das Vorliegen einer rezeptorvermittelten Wirkung müssen folgende 4 Kriterien erfüllt sein: 1.) Stereoisomere eines Bindungsmoleküls müssen sich in ihrer Wirksamkeit unterscheiden (Kriterium der Stereoselektivität), 2.) Langzeitexposition mit Agonisten muss eine Desensitisierung bewirken, 3.) es muss ein endogener Ligand vorliegen und 4.) muss ein Antagonist identifiziert werden.

Die Arbeitsgruppen von Noel Morgan und Susan Chan veröffentlichten in einer Reihe von Publikationen Befunde, die nahe legten, dass für die insulinsekretionssteigernde Wirkung der Imidazoline alle 4 genannten Kriterien erfüllt seien. Im Hinblick auf Punkt 1 zeigten Chan et

al. 1993, dass die Stereoisomere des insulinsekretionssteigernden Imidazolins Efaroxan deutliche Unterschiede in ihrer Wirksamkeit aufwiesen (CHAN et al., 1993). Für das (+)-Enantiomer (synonym RX851034) beschrieben sie, dass dieses in statisch inkubierten Ratten Inseln die durch  $\alpha_2$ -Agonisten gehemmte Insulinsekretion stärker wieder anheben konnte als das (-)-Enantiomer (synonym RX851033) in äquimolaren Konzentrationen. Dafür steigerte das (-)-Enantiomer die durch Diazoxid gehemmte Insulinsekretion stärker als das (+)-Enantiomer in äquimolaren Konzentrationen. Diese letzte Eigenschaft wurde durch Wirkungen auf  $K_{ATP}$ -Kanäle vermittelt. Die eigene sekretionssteigernde Wirkung des (-)-Enantiomers des Efaroxans war in Gegenwart von 6 mM Glucose fast doppelt so stark ausgeprägt wie die des (+)-Enantiomers. Im Widerspruch zu der durch Chan und Mitarbeitern beschriebenen Stereoselektivität stehen Ergebnisse aus der Gruppe um Henquin. Henquins Mitarbeiter belegten für das Imidazolin SL84.0418 an der B-Zelle Stereoselektivität nur für die über  $\alpha$ -Adrenozeptoren vermittelten Wirkungen nicht aber für den Schluss des  $K_{ATP}$ -Kanals, der u. a. für die insulinsekretionssteigernde Wirkung der Imidazoline verantwortlich gemacht wurde (JONAS et al., 1994). Damit wiesen sie auf eine weniger spezifische Interaktion mit dem  $K_{ATP}$ -Kanalprotein hin und verringerten die Wahrscheinlichkeit, dass die insulinsekretionssteigernde Wirkung der Imidazoline Stereoselektivität aufweist. Diese Ansicht wurde durch einen Befund aus der Gruppe von F. Ashcroft unterstützt. Sie fanden, dass eine C-terminal trunkierte Variante von  $K_{ir}6.2$ , die im Gegensatz zum Wildtyp auch ohne die gleichzeitige Expression von SUR1 an die Plasmamembran gelangt und Kanalaktivität zeigt (TUCKER et al., 1997), durch Phentolamin in den gleichen Konzentrationen wie der natürliche, aus  $K_{ir}6.2$  und SUR1 bestehende,  $K_{ATP}$ -Kanal gehemmt wurde (PROKS und ASHCROFT, 1997). Dieses spricht dafür, dass zumindest Phentolamin den Ionenkanal durch direkte Blockade der Ionenpore schließt und nicht durch Bindung an einem Rezeptor, der Stereoisomere unterscheiden könnte. Allerdings wurde bisher die  $K_{ATP}$ -Kanal blockierende Wirkung von Stereoisomeren noch nicht getrennt untersucht.

Im Zusammenhang mit den Befunden zur Stereoselektivität beschrieb die Arbeitsgruppe von Chan auch, dass stimulatorisch wirksame Imidazoline wie Phentolamin und Efaroxan im Gegensatz zu scheinbar unwirksamen Imidazolininen wie Idazoxan eine homologe Desensibilisierung (CHAN et al., 1993) bewirkten. Unter einer homologen Desensibilisierung versteht man das selektive Ausbleiben einer Reaktion auf Stimuli einer bestimmten Substanzklasse wie z.B. den Imidazolininen, während auf Stimuli einer anderen Substanzklasse wie z.B. den Sulfonylharnstoffen eine unveränderte Reaktion erfolgt. Damit schien auch das zweite Kriterium für das Vorliegen einer rezeptorvermittelten Wirkung der Imidazoline erfüllt

zu sein. In mit Efaroxan vorinkubierten Ratten Inseln konnte ein erneutes Einwirken von Efaroxan während einer statischen Inkubation die Diazoxid-induzierte Hemmung der Insulinsekretion nicht mehr aufheben. Durch 20 mM Glucose war auch in vorinkubierten Inseln eine der Kontrolle vergleichbare Steigerung der Insulinsekretion zu beobachten (CHAN et al., 1993). Hinsichtlich der Aussage, dass Imidazoline eine homologe Desensitisierung auslösen, besteht Kritik durch Rustenbeck und Mitarbeiter (RUSTENBECK et al., 2001 a und b). Sie zeigten, dass durch diverse Stimuli, die alle eine länger anhaltende Depolarisation bewirkten, eine Desensitisierung gegenüber der durch Imidazoline induzierten Steigerung der Insulinsekretion ausgelöst werden konnte. Außerdem zeigten sie, dass die mit Imidazolinen vorinkubierten Inseln auch gegenüber anderen durch Depolarisation insulinsekretionssteigernd wirkenden Stimuli wie Tolbutamid oder hohes extrazelluläres Kalium desensitisierten. Das heißt, dass diese Stimuli in mit Imidazolinen vorbehandelten Inseln eine verminderte Steigerung der Insulinsekretion im Vergleich zur Kontrolle bewirkten. Diese Beobachtungen lassen sich nur schwierig mit einer rezeptorvermittelten Wirkung der Imidazoline in Einklang bringen, da eine Depolarisation durch hohes extrazelluläres Kalium allein durch das Nernst-Potential erklärbar ist und nicht durch einen Rezeptor vermittelt wird.

Auf der Suche nach einem endogenen Liganden an Imidazolin-Bindungsstellen, welcher das dritte Kriterium für eine rezeptorvermittelte Wirkung darstellt, wurden bisher Extrakte verschiedener Organe unterschiedlicher Spezies identifiziert (ATLAS und BURSTEIN, 1984; SINGH et al., 1995). Diese Extrakte wurden als Clonidin-displacing substances (CDS) bezeichnet. Als wirksame Komponente dieser Extrakte postulierte die Arbeitsgruppe um Reis das Decarboxylationsprodukt des Arginins, das Agmatine (LI et al., 1994). In älteren Publikationen wurden Ergebnisse publiziert, die im Gegensatz zu den Ergebnissen von Reis nur eine niedrige Affinität des Agmantins zu Imidazolin-Rezeptoren (ATLAS und BURSTEIN, 1984) belegten. Neben Agmantin wurden bisher Tryptamin, eine als Tryptoline oder synonym beta-Carboline bezeichnete Substanzklasse (HUDSON et al., 1999) und Imidazoleacetic acid-ribotide (PRELL et al., 2004) als wirksame Substanzen mit hoher Affinität zu Imidazolin-Rezeptoren diskutiert. Für einige der als endogene Liganden diskutierten Substanzen wie CDS (CHAN, 1997), beta Carboline (COOPER et al., 2003; SQUIRES et al., 2004) und Imidazoleacetic acid-ribotide (PRELL et al., 2004) wurde eine insulinsekretionssteigernde Wirkung beschrieben. Als Bestätigung dafür, dass Imidazoleacetic acid-ribotide seine insulinsekretionssteigernde Wirkung über einen möglichen I<sub>3</sub>-Rezeptor an der B-Zelle vermittelt, wurde die Beobachtung herangezogen, dass

der mutmaßliche  $I_3$ -Rezeptor-Antagonist KU14R in der Lage war, die durch Imidazoleacetic acid-ribotide bewirkte Steigerung der durch Diazoxid gehemmten Insulinsekretion wieder aufzuheben.

Die Identifizierung eines Antagonisten ist die vierte Voraussetzung für eine rezeptorvermittelte Wirkung. Als erster mutmaßlicher Imidazolin-Rezeptor-Antagonist in Bezug auf die insulinsekretionssteigernde Wirkung galt die Substanz RX801080 (BROWN et al., 1993). 1997 zeigten Chan und Mitarbeiter, dass die durch CDS gesteigerte Insulinsekretion (CHAN et al., 1997) durch das Imidazolinderivat RX801080 antagonisiert werden konnte. Die Substanz KU14R wurde 1996 als Antagonist der Efaroxan vermittelten insulinsekretionssteigernde Wirkung vorgestellt (MORGAN et al., 1996). KU14R unterscheidet sich von Efaroxan durch eine zusätzliche Doppelbindung, so dass ein Imidazolring an die Stelle des Imidazolinrings getreten ist. Der antagonistische Wirkmechanismus des KU14Rs soll darin bestehen, dass KU14R  $K_{ATP}$ -Kanäle, die durch Efaroxan geschlossen wurden, wieder öffnen konnte (CHAN et al., 1998). Gleichzeitig wurde für KU14R aber eine eigene  $K_{ATP}$ -Kanal-blockierende Wirkung beschrieben. Die antagonistische Wirksamkeit von KU14R auf die durch Efaroxan gesteigerte Insulinsekretion konnte durch die Arbeitsgruppen von Flatt und Taberner nicht bestätigt werden. Die Gruppe von Flatt fand in BRIN-BD11-Zellen eine synergistische, insulinsekretionssteigernde Wirkung zwischen KU14R und Efaroxan (BALL et al., 2000). Die Mitarbeiter um Taberner beschrieben *in vivo* bei Mäusen ebenfalls eine additive Wirkung beider Substanzen (MAYER und TABERNER, 2002).

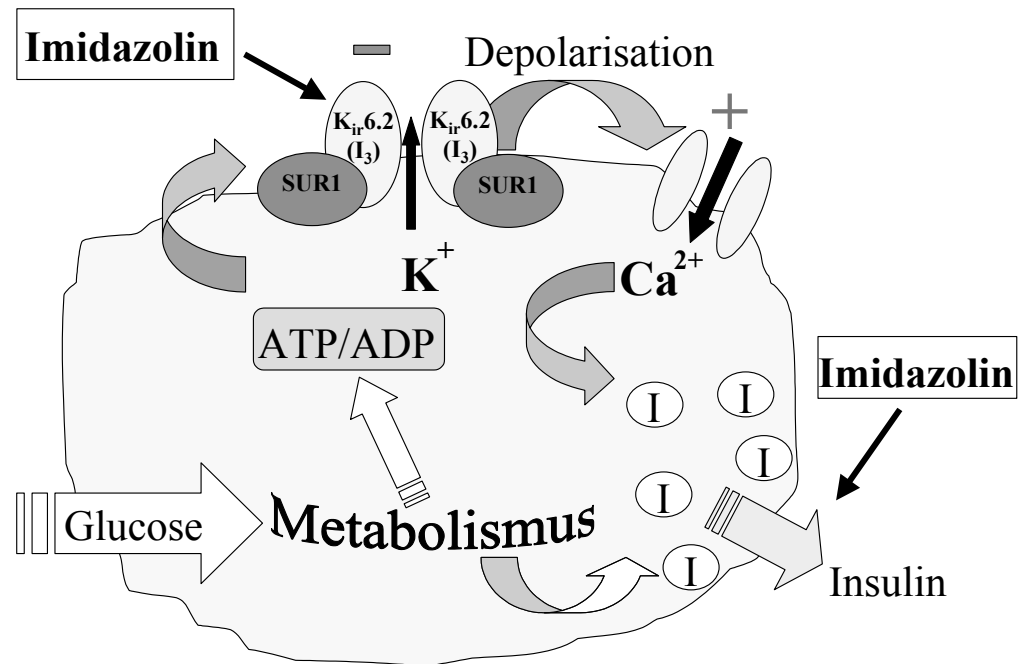
Weil das Vorliegen der 4 Kriterien für eine rezeptorvermittelte Wirkung der Insulinsekretionssteigerung durch Imidazoline umstritten und mit dem Nachweis der direkten Wirkung auf  $K_{ir6.2}$  weniger wahrscheinlich, wenn auch nicht unmöglich, geworden ist, entwickelte sich eine alternative Hypothese.

Als alternative Hypothese gilt zur Zeit, dass eine Addition mehrerer von einander unabhängiger Wirkungen vorliegt. Da sich die Charakteristika der Imidazolin induzierten Sekretion von den Charakteristika der durch Sulfonylharnstoffen induzierten Sekretion unterscheiden (SCHULZ und HASSELBLATT, 1988) kann der Schluss des  $K_{ATP}$ -Kanals nicht die einzige Wirkung der Imidazoline sein. Zum Beispiel sollen Imidazoline bestimmte noch nicht näher identifizierte Strukturen, die nach einem Anstiegs der cytosolischen Calcium-Konzentration für die Insulinsekretion bedeutsam werden, aktivieren. Diese Wirkungen wurden als distale Effekte bezeichnet und zuerst durch Zaitsev beschrieben (ZAITSEV et al., 1996). Auf Grund dieser alternativen Hypothese kam es zur Entwicklung



von Substanzen mit Imidazolin-Struktur ohne  $K_{ATP}$ -Kanal blockierende aber mit deutlich insulinsekretionssteigernder Wirkung (EFANOV et al., 2001a), die dann ausschließlich über distale Effekte vermittelt und glucoseselektiv sein sollte. Solche Imidazoline werden als Imidazoline der zweiten Generation bezeichnet (EFENDIC et al., 2002). Es bleibt aber die Frage, ob die Hypothese, dass Blockade von  $K_{ATP}$ -Kanälen grundsätzlich zu einer Stimulation der Insulinsekretion bei basaler oder sogar abwesender Glucose-Konzentration führt, aufrecht erhalten werden kann. Wäre die eben genannte Annahme wahr, dann würde es bedeuten, dass nur die distalen Effekte, die konzeptionell dem „*amplifying pathway*“ zuzuordnen sind, die einzigen therapeutisch interessanten Angriffspunkte darstellten. Für die Beantwortung dieser Frage muss ein lange vernachlässigter Aspekt der Wirkung der klassischen,  $K_{ATP}$ -Kanal wirksamen Imidazoline, also Imidazoline der ersten Generation, in Betracht gezogen werden. Die sekretionssteigernde Wirkung innerhalb dieser Gruppe der Imidazoline ist unterschiedlich. Phentolamin, das prototypische Imidazolin, wies zum Beispiel keine Glucoseselektivität auf (RUSTENBECK et al., 1999). Dieses lässt sich mit der schließenden Wirkung von Phentolamin auf  $K_{ATP}$ -Kanäle erklären. Gleichzeitig wird für Efaroxan trotz schließender Wirkung auf  $K_{ATP}$ -Kanäle eine glucoseselektive Steigerung der Insulinsekretion berichtet. Allerdings waren frühere Befunde, die für Efaroxan eine Glucoseselektivität zeigen sollten (CHAN und MORGAN, 1990), nicht eindeutig. Es stellte sich daher die Frage, ob die distalen Effekte einiger Imidazoline der ersten Generation inhibitorisch seien und sich damit durch Addition von bisher nicht aufgeklärten inhibitorischen und stimulatorischen Effekten, die z.B. im Schluss der  $K_{ATP}$ -Kanäle bestehen, eine Glucoseselektivität ergibt. Die unterschiedliche Glucoseselektivität der einzelnen Imidazoline könnte dann durch eine unterschiedliche Balance zwischen den Angriffen auf die jeweiligen inhibitorischen und stimulatorischen Angriffspunkte erklärt werden.

Mit den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen sollten die für die Glucoseselektivität verantwortlichen Wirkmechanismen der Imidazoline der ersten Generation aufgeklärt und die Frage beantwortet werden, inwieweit die glucoseselektive Steigerung der Insulinsekretion mit einer schließenden Wirkung der Imidazoline auf  $K_{ATP}$ -Kanäle kompatibel ist. Dazu wurden vor allem die Effekte von Phentolamin, RX871024, Efaroxan und seinem Imidazol-Analogen KU14R untersucht. Zusätzlich wurde eine neuartige elektrophysiologische Methode etabliert, um Messungen an Zellen in der intakten Insel, also unter physiologienahen Bedingungen durchführen zu können.



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der möglichen Angriffspunkte der Imidazoline innerhalb der Stimulus-Sekretions-Kopplung. Neben einem Schluss des  $K_{ATP}$ -Kanals sollen Imidazoline distale Effekte aufweisen, die zu einer Steigerung der Insulinsekretion führen.

## 2 Zielsetzung und Fragestellung

Für die Therapie des Typ 2 Diabetes mellitus wären Pharmaka, die nur dann die Insulinsekretion steigern, wenn die Blutglucosekonzentration über dem Nüchternwert liegt, ein wesentlicher Fortschritt. Idealerweise könnte mit solchen Substanzen eine antidiabetische Therapie ohne Hypoglykämierisiko durchgeführt werden. Einige Vertreter aus der Substanzklasse der Imidazoline (v.a. Efaroxan, Alinidin) zeigen *in vitro* diese Eigenschaft (Glucoseselektivität der Wirkung) und könnten somit Ausgangspunkt für die Entwicklung solcher Pharmaka werden. Sicher ist, dass eine Reihe von älteren Imidazolininen den ATP-abhängigen Kaliumkanal ( $K_{ATP}$ -Kanal) der insulinsezernierenden B-Zellen des Pankreas blockieren. In wieweit dieser Effekt mit den Charakteristika der insulinsekretionssteigernden Wirkung kompatibel ist und in welchem Ausmaß zusätzliche Effekte für das Zustandekommen einer glucoseselektiven Steigerung der Insulinsekretion zu fordern sind, ist umstritten.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Mechanismen der glucoseselektiven Steigerung der Insulinsekretion durch den Vergleich ausgewählter Imidazoline hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Insulinsekretion, die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität und das Plasmamembranpotential pankreatischer B-Zellen weiter aufgeklärt werden. Insbesondere sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede in der Glucoseselektivität der Imidazoline und ist diese Wirkqualität mit einer hemmenden Wirkung auf den  $K_{ATP}$ -Kanal zu vereinbaren?
2. Ist KU14R, das Imidazol-Analogon des insulinsekretionssteigernden Imidazolins Efaroxan, ein Antagonist für Imidazoline an B-Zellen (sog.  $I_3$ -Rezeptor-Antagonist), hat diese Substanz eine Wirkung auf  $K_{ATP}$ -Kanäle und wenn ja, wie kommt diese zustande?
3. Kann eine Hemmung des Energiestoffwechsels der B-Zelle die hemmende Wirkung von Imidazolininen auf den  $K_{ATP}$ -Kanal antagonisieren, d.h. können endogene Regulatoren des  $K_{ATP}$ -Kanals die Wirkung von Imidazolininen modulieren?
4. Unterscheidet sich die Wirkung der Imidazoline auf elektrophysiologische Parameter in der intakten Insel von der auf einzelne isolierte Insel-Zellen? Dazu sollte eine Methode aufgebaut werden, die es erlaubt, elektrophysiologische Messungen an B-Zellen im Verband von Pankreasinseln durchzuführen. Hierdurch sollen physiologienähere Versuchsanordnungen als diejenigen, die mit kultivierten Einzelzellen erreichbar sind, ermöglicht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Inselisolierung und Einzelzellgewinnung

##### 3.1.1 Verwendete Lösungen

###### 3.1.1.1 Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer

Als Basismedium für die Isolierung der Langerhans'schen Inseln diente ein modifizierter Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer, der im folgenden Krebs-Ringer-Lösung genannt wird. Weil durch Entweichen von CO<sub>2</sub> der Puffer alkalisch werden würde, wurde zur Stabilisierung des pH-Wertes ein Teil des Bicarbonats durch den nicht flüchtigen organischen HEPES-Puffer ersetzt (LERNMARK, 1974).

Für 2 Liter Krebs-Ringer-Lösung wurden

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 4,766 g   | HEPES (Roth, M <sub>r</sub> = 238,31 g/mol)                                   | (10 mM)    |
| 752,74 mg | CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (Merck, M <sub>r</sub> = 147,02 g/mol) | (2,56 mM)  |
| 700,77 mg | KCl (Merck, M <sub>r</sub> = 74,55 g/mol)                                     | (4,7 mM)   |
| 326,26 mg | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck, M <sub>r</sub> = 136,09 g/mol)        | (1,2 mM)   |
| 591,55 mg | MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O (Merck, M <sub>r</sub> = 246,48 g/mol) | (1,2 mM)   |
| 13,441 g  | NaCl (Roth, M <sub>r</sub> = 58,44 g/mol)                                     | (115 mM)   |
| 2,000 g   | Albumin (Serva, M <sub>r</sub> = ca. 67000)                                   | 0,1% (m/V) |
| 1,982 g   | D-Glucose-Monohydrat (Merck, M <sub>r</sub> = 198,17 g/mol)                   | (5 mM)     |
| 3,360 g   | NaHCO <sub>3</sub> (Merck, M <sub>r</sub> = 84,01 g/mol)                      | (20 mM)    |

in Aqua bidest. gelöst. Nach Einstellung des pH-Werts mit 1N NaOH auf 7,4 wurde der Gesamtansatz sterilfiltriert (Vorfilter: Glasfaser Prefilter 13400-130-K; Hauptfilter: Cellulose-Acetat-Filter, Porengröße 0,2 µm, 11107-142-G, Sartorius) und in autoklavierte oder sterilisierte 100 ml Gefäße abgefüllt. Die Einzelvolumina wurden bei 2°C bis 8°C aufbewahrt.

### 3.1.1.2 Calciumfreie Lösung zur Gewinnung von Einzelzellen aus Langerhans'schen Inseln

Für 100 ml calciumfreie Lösung wurden

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 595,78 mg | HEPES (Roth, $M_r = 238,31$ g/mol)                                       | (25 mM)   |
| 19,02 mg  | EGTA (Sigma, $M_r = 380,4$ g/mol)  | (0,5 mM)  |
| 35,78 mg  | KCl (Merck, $M_r = 74,55$ g/mol)   | (4,8 mM)  |
| 16,33 mg  | $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Merck, $M_r = 136,09$ g/mol)                   | (1,2 mM)  |
| 29,58 mg  | $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, $M_r = 246,48$ g/mol) | (1,2 mM)  |
| 788,94 mg | NaCl (Roth, $M_r = 58,44$ g/mol)   | (135 mM)  |
| 59,45 mg  | D-Glucose-Monohydrat (Merck, $M_r = 198,17$ g/mol)                       | (3 mM)    |
| 1,000 g   | Albumin (Serva, $M_r = \text{ca. } 67000$ g/mol)                         | 1 % (m/V) |

in Aqua bidest. gelöst. Nach Einstellung des pH-Werts mit 1N NaOH auf 7,4 wurde der Gesamtansatz sterilfiltriert (Filtropur S plus 0,2  $\mu\text{m}$ , Sarstedt) und in Einzelvolumina zu je 5 ml abgefüllt. Die Einzelvolumina wurden bei 2°C bis 8°C aufbewahrt.

### 3.1.1.3 RPMI-Medien für die Zellkultur

#### 3.1.1.3.1 A) Vorinkubation (RPMI 1640 mit 10 mM Glucose)

Für die ersten 3 Stunden der Zellkultur der isolierten Einzelzellen wurde RPMI 1640-Medium mit 10 mM Glucose verwendet. Bei dieser Glucose-Konzentration wurde gegenüber 5 mM Glucose ein stärkeres Anwachsen der Zellen auf dem Boden der Zellkulturschale (Nunc<sup>TM</sup> Surface, Nunc) beobachtet.

Für 1 Liter zu verwendende Lösung wurden

|          |  |
|----------|--|
| 10,420 g | RPMI 1640 (Seromed, Cat No. T 121 – 10, w L-Glutamine) |
| 2,000 g  | $\text{NaHCO}_3$ (Merck)                               |

in 0,9 Liter Aqua bidest. gelöst.

Penicillin und Streptomycin wurden bis zu einer Endkonzentration von 100 IU/ml Penicillin (Biochrom AG) und 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin (Biochrom AG) auf ein Volumen von 1 Liter bezogen ergänzt.

Nach Einstellung des pH-Werts auf 7,2 wurde der Ansatz sterilfiltriert und in Einzelportionen zu 90 ml abgefüllt und bei 2°C bis 8°C gelagert.

Vor Gebrauch wurde den Einzelportionen 10 ml fötales Kälberserum (FCS) (PAA Laboratories, Pasching) zugegeben, so dass 100 ml Endlösung 10 % FCS enthielten.

### *3.1.1.3.2 B) Hauptinkubation (RPMI 1640 mit 5 mM Glucose)*

Für die Hauptinkubation, die 3 Stunden nach Gewinnung der Einzelzellen begann, wurde RPMI 1640-Medium mit 5 mM Glucose verwendet. Diese Glucose-Konzentration bewirkt keine Stimulation der Insulinsekretion pankreatischer B-Zellen der Maus.

Für 1 Liter zu verwendende Lösung wurden

8,440 g        RPMI 1640 (Gibco BRL, WIE 074-01800, w L-Glutamine, w/o D-Glucose)

0,991 g        D-Glucose-Monohydrat (Merck) (5 mM)

2,000 g        NaHCO<sub>3</sub> (Merck)

in 0,9 Liter Aqua bidest. gelöst.

Penicillin und Streptomycin wurden bis zu einer Endkonzentration von 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin auf ein Volumen von 1 Liter bezogen ergänzt.

Nach Einstellung des pH-Werts auf 7,2 wurde der Ansatz sterilfiltriert und in Einzelportionen zu 90 ml abgefüllt und bei 2°C bis 8°C aufbewahrt.

Vor Gebrauch wurde den Einzelportionen 10 ml FCS zugegeben, so dass 100 ml Endlösung 10% FCS enthielten.

### **3.1.2 Isolierung der Langerhans'schen Inseln und anschließende Einzelzellgewinnung**

Die Langerhans'schen Inseln wurden durch Kollagenase-Andauung des isolierten Pankreas gewonnen (MOSKALEWSKI, 1965). Es wurden Modifikationen verschiedener beschriebener Techniken (LACY und KOSTIANOVSKY, 1967; LERNMARK, 1974) angewendet.

Nach Dekapitation der Maus wurde das Fell im Abdominalbereich mit Ethanol desinfiziert und von der Subkutis getrennt. Anschließend wurde die Bauchhöhle geöffnet, das Pankreas vollständig entnommen, in 3 ml Krebs-Ringer-Lösung (3.1.1.1) überführt und von eventuell anhaftendem Fettgewebe befreit. Danach wurde das Pankreas in 2 ml Krebs-Ringer-Lösung 2 Minuten lang mit einer Schere zerkleinert. Die Suspension mit den Gewebeschnittstücken wurde zu 1 mg Kollagenase (Collagenase P, Fa. Boehringer Mannheim) in ein Glas-Schraubdeckelgefäß pipettiert und bei 37 °C im Schüttelwasserbad bei einer Frequenz von 328 U/min für 7 bis 8 Minuten inkubiert. Die Aktivitäten verschiedener Kollagenase-Chargen kann geringfügig variieren, so dass die Inkubationszeit bei Chargenwechsel angepasst werden musste. Nach der Inkubation wurde das Gefäß mit Krebs-Ringer-Lösung aufgefüllt, um die Konzentration der Kollagenase zu verdünnen und damit ihre Wirkung zu hemmen. Das angedaute Pankreasgewebe wurde 5 Minuten zum Sedimentieren gestellt. Nach Absaugen des Überstands wurde das Gefäß erneut mit Krebs-Ringer-Lösung gefüllt und der Inhalt anschließend in eine schwarze Glaspetrischale überführt. Unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss) und der Beleuchtung durch Kaltlichtquellen (KL 150B, Schott) wurden die freigesetzten Langerhans'schen Inseln mit einer Eppendorf-Pipette aus dem angedautem exokrinen Pankreasgewebe herauspipettiert und in einer weiteren mit Krebs-Ringer-Lösung gefüllten Petrischale gesammelt. Dort wurden die Inseln mit Hilfe von Kanülen von eventuell noch anhaftenden exokrinen Gewebe befreit. Dieser Reinigungsschritt wurde ein- bis zweimal wiederholt, bevor die Inseln in einem schwarzen, konischen Plastikgefäß gesammelt und die Krebs-Ringer-Lösung soweit wie möglich abgenommen wurde. Die so isolierten Pankreas-Inseln wurden für Perifusionsversuche oder zur Gewinnung von Einzelzellen verwendet.

Zur Gewinnung von Einzelzellen wurden 500 µl calciumfreie Lösung (3.1.1.2) in das konische Gefäß gegeben, zusammen mit den Inseln wieder aufgenommen und zu 4,5 ml calciumfreier Lösung pipettiert, um den Zellverband zu lösen. Zu Beginn der Inkubationszeit von 10 Minuten wurde der Ansatz für 10 Sekunden und zum Ende der Inkubationszeit für 1 Minute auf Stufe 8 gevortext (Vortex-Genie 2, Scientific Industries). Anschließend wurde der Ansatz 1 Minute bei 20 °C und 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, bevor die

calciumfreie Lösung soweit wie möglich abgesaugt und durch 5 ml RPMI-Lösung mit 10 mM Glucose (3.1.1.3.1) ersetzt wurde. Nach Vortexen für 10 Sekunden wurde erneut wie oben angegeben zentrifugiert. Danach wurde das RPMI-Medium bis auf ca. 100 µl abgesaugt und das verbliebene RPMI-Medium mit den Inselzellen mehrmals in einer Pipettenspitze hochgesaugt und wieder abgegeben, um verbliebene Zellaggregate zu lösen. Anschließend wurden die Zellen mit dieser Pipettenspitze in die Mittelpunkte Plastikpetrischälchen mit 35 mm Durchmesser (Nunc<sup>TM</sup> Surface, Nunc) zu Anteilen von je 10 µl aufgeteilt. Für Zellen aus 10 isolierten Inseln wurde jeweils 1 Petrischale vorbereitet. Die Zellen wurden 3 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> (V/V) und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank inkubiert, damit möglichst viele Zellen im Zentrum der Petrischalen oder Deckgläschen anwachsen, bevor pro Petrischale 2,5 ml RPMI-Medium mit 5 mM Glucose (3.1.1.3.2) zugegeben wurden. Anschließend wurde die Zellkultur fortgesetzt. Nach 24 bis 96 Stunden erfolgten elektrophysiologische Untersuchungen.

Um eine höhere Ausbeute an Inseln pro Pankreaspräparation zu erzielen, wurde im Laufe dieser Arbeit die Isolierung auf die Methode nach GOTOH et al. (1985) mit Modifikationen nach ZIMNY et al. (1993) umgestellt. Vor der Verwendung der durch diese Methode gewonnenen B-Zellen wurde geprüft, ob die Gewinnungsmethode das Verhalten der B-Zellen gegenüber bekannten Stimuli wie Tolbutamid und einer Kalium-Depolarisation beeinflusste. Die B-Zellen zeigten unabhängig von der Gewinnungsmethode eine identische Reaktion. Zur Isolierung der Langerhans'schen Inseln nach GOTOH wurde Kollagenaselösung über den Ductus choledochus (Gallengang) in das Pankreas injiziert. Dazu wurden 1 mg Kollagenase (Collagenase P, Fa. Boehringer) pro ml kalter Krebs-Ringer-Lösung gelöst und das Volumen einer sterilen 2 ml Plastikspritze (Injekt, Braun) gefüllt. Auf die Öffnung der Spritze wurde anschließend eine sterile Kanüle (BD Microlance<sup>TM</sup> 3, 0,3x13, Luer-Lock, 30GA ½) gesteckt. Nach Dekapitation wurde die Maus auf einem Klemmbrett festgespannt. Die Bauchhöhle wurde wie oben beschrieben geöffnet. Dann wurde der Körper der Maus so ausgerichtet, dass er kaudal vom Präparator weg wies. Anschließend wurde der Gallengang freipräpariert und die Mündung des Gallengangs in den Zwölffingerdarm mit einer Gefäßklemme abgeklemmt. Der gespannte Gallengang wurde kanüliert und die bis dahin auf Eis gelagerte Kollagenaselösung injiziert, wodurch die Lösung retrograd über den Ductus pancreaticus das Pankreas auffüllte. Das gesamte Pankreas dehnte sich beim Einfließen der Kollagenaselösung deutlich sichtbar aus. Es wurde anschließend mit sterilisierten Pinzetten entnommen, in ein unten konisch zulaufendes 10 ml Plastikschraubdeckelgefäß (Sarstedt) überführt und für 20 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 5 ml kalter Krebs-Ringer-



Lösung zu dem angedauten Pankreasgewebe wurde die enzymatische Aktivität der Kollagenase gehemmt. Durch kurzzeitiges Schütteln des Plastikgefäßes wurde das Gewebe mechanisch in Fragmente zerkleinert, bevor es 15 Sekunden bei Raumtemperatur mit 300 g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgenommen, verworfen und der Waschschrift wurde wiederholt. Anschließend wurde das Gewebelysat mit Krebs-Ringer-Lösung in eine schwarze Glas-Petrischale überführt und die Inseln wie oben beschrieben separiert. Die Separation durch Pipettieren in eine neue mit Krebs-Ringer-Lösung gefüllte Petrischale wurde dreimal wiederholt. Die Gewinnung der Einzelzellen erfolgte anschließend wie oben beschrieben.

### **3.1.3 Anfertigung von Pankreasschnitten**

Es wurde eine 1,9 %ige Lösung von low melting Agarose (SeaPlaque Agarose, Cambrex) in extrazellulärer Lösung für Gewebeschnitte (3.3.1.2) hergestellt. Die Agarose-Lösung wurde auf 37°C temperiert. Nach Dekapitation der Maus und Freipräparation des Gallengangs wurden mindestens 1 ml der Agarose-Lösung mit einer sterilen 2 ml Plastik-Einmalspritze mit einer Kanüle (BD Microlance<sup>TM</sup> 3, 0,3x13, Luer-Lock, 30GA ½) langsam unter gleichmäßigem Druck in den Gallengang injiziert. Die Agarose-Lösung, die während des Einspritzens schnell erstarrte, lief retrograd über den Ductus pancreaticus in das Pankreas hinein. Nach der Injektion wurde bis dahin auf Eis gekühlte extrazelluläre Lösung für Gewebeschnitte über das Pankreas gegossen, um die Aktivität der exokrinen Verdauungsenzyme zu minimieren. Das durch die Agarose-Injektion gehärtete Pankreas wurde entnommen und in eine mit eiskalter extrazelluläre Lösung für Gewebeschnitte gefüllte Plastikpetrischale überführt. Anschließend wurde es unter dem Stereomikroskop in viereckige Stücke geschnitten. Dabei wurde auf eine möglichst waagerechte Oberfläche geachtet, damit beim späteren Anfertigen der Gewebeschnitte mit dem Vibratom die Schnittebenen möglichst parallel verliefen. Die Pankreasstücke wurden in eine mit noch flüssiger Agarose-Lösung gefüllte Plastik-Petrischale (Durchmesser 35 mm) überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Pankreasstücke nicht zu tief in die langsam erstarrende Agarose-Lösung einsanken, damit später die letzte Schnittebene nicht zu nah an der Oberkante des Schneideblocks des Vibratoms lag.

Aus der erstarrten Agarose wurden die Pankreasstücke als Blöcke herausgeschnitten und mit Gewebekleber (Superglue 90-120 CPS, WPI Inc.) auf die Halterung des Vibratoms (FTB, Vibracut 1.4) geklebt. Die Vibratomwanne wurde mit gekühlter extrazellulärer Lösung für Gewebeschnitte gefüllt. Zusätzlich wurden Eiswürfel aus eingefrorener extrazellulärer Lösung

für Gewebeschnitte in die Wanne gegeben. Diese Lösung wurde während der Herstellung der Schnitte mit Carbogen begast. Es wurde mit einem Einstellwinkel von 5 Grad und einer Schwingungsfrequenz von 70 Hz und einer Geschwindigkeit von 0,2 mm pro sec geschnitten. Die Schnitte hatten eine Dicke von 140 µm.

Die Schnitte wurden in eine auf Eis gehaltene mit extrazellulärer Lösung gefüllte Plastikpetrischale (Durchmesser 100 mm) überführt, durch deren Deckel eine Begasung mit Carbogen erfolgte.

Vor Beginn der elektrophysiologischen Versuche wurden die Schnitte 30 Minuten bei 30 °C in mit Carbogen begaster extrazellulärer Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in die Badkammer des Patch-Clamp-Setups überführt.

Größere Inseln waren zum Teil mit bloßen Auge im Pankreasschnitt als weiße Punkte zu erkennen. Ansonsten wurden die Pankreasschnitte unter dem Mikroskop auf enthaltene Inseln überprüft.

### **3.1.4 HEK 293-Zellen**

HEK (human embryonic kidney) 293-Zellen (GRAHAM et al., 1977), die an der MH Hannover mit dem als Expressionsvektor verwendeten pcDNA3 K<sub>ir</sub>6.2ΔC26 Plasmid stabil transfiziert worden waren, so dass sie eine C-terminal-trunkierte Variante der porenbildenden Untereinheit, K<sub>ir</sub>6.2ΔC26, dauerhaft exprimierten, wurden in DMEM Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (V/V) und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Alle 3 bis 4 Tage wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch neues Medium ersetzt.

#### *3.1.4.1 Kulturmedium DMEM (DMEM Trockenmedium, NaHCO<sub>3</sub> , FCS 10% (V/V), 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin)*

50,75 g Trockenmedium und 18,50 g NaHCO<sub>3</sub> wurden in 4 l autoklaviertem Aqua bidest. unter Rühren gelöst. Der pH-Wert wurde mit 37-prozentiger HCl auf 7,2 eingestellt. Nach Zugabe von 500 ml hitzeinaktiviertem FCS und 50 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung wurde das Volumen auf 5 l mit autoklaviertem Aqua bidest. aufgefüllt und sofort sterilfiltriert.

## 3.2 Perifusion

### 3.2.1 Basismedium für die Perifusion

Als Medium für die Perifusion der Pankreasinseln diente ein modifizierter HEPES-haltiger Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer mit Albuminzusatz (KRHA-Puffer). Dieser wurde im Gegensatz zu der für die Inselisolierung verwendeten Krebs-Ringer-Lösung nicht sterilfiltriert und deswegen täglich frisch aus den Stammlösungen 1 bis 7 angesetzt und vor Gebrauch 30 Minuten mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast, um einen pH-Wert von 7,4 zu erreichen. Die Äquilibration geschah zur Verhütung von Schaumbildung vor Zugabe der Albuminhaltigen Stammlösung 7. Nach Herstellung wurde der Puffer auf 37 °C temperiert.

#### 3.2.1.1 Stammlösung 1 (0,90 % NaCl)

18,000 g Natriumchlorid (Roth, M<sub>r</sub> = 58,44 g/mol) wurden in 2 l Aqua bidest. gelöst.

#### 3.2.1.2 Stammlösung 2 (1,15 % KCl)

5,750 g Kaliumchlorid (Merck, M<sub>r</sub> = 74,55 g/mol) wurden in 500 ml Aqua bidest. gelöst.

#### 3.2.1.3 Stammlösung 3 (1,62 % CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O)

8,100 g Calciumchlorid-Dihydrat (Merck, M<sub>r</sub> = 147,02 g/mol) wurden in 500 ml Aqua bidest. gelöst.

#### 3.2.1.4 Stammlösung 4 (2,11 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

5,275 g Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, M<sub>r</sub> = 136,09 g/mol) wurden in 250 ml Aqua bidest. gelöst.

#### 3.2.1.5 Stammlösung 5 (3,82 % MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O)

9,550 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Merck, M<sub>r</sub> = 246,48 g/mol) wurden in 250 ml Aqua bidest. gelöst.

#### 3.2.1.6 Stammlösung 6 (1,30 % NaHCO<sub>3</sub>)

13,000 g Natriumhydrogencarbonat (Merck, M<sub>r</sub> = 84,01 g/mol) wurden in 1 l Aqua bidest. gelöst. Die Lösung wurde anschließend 30 Minuten lang mit CO<sub>2</sub> begast.

Die Stammlösungen 1 bis 6 wurden bis zu 2 Wochen bei 4 °C gelagert.

### 3.2.1.7 Stammlösung 7 (6,5 % Albumin, 7,74 % HEPES, 154 mM NaOH)

65,000 g Rinderserumalbumin (Fraktion V, Serva,  $M_r$  = ca. 67000) wurden in 400 ml Aqua bidest. gelöst. 77,4 g HEPES (Roth,  $M_r$  = 238,31 g/mol) wurden in 200 ml Aqua bidest. gelöst. Der HEPES-Lösung wurden 154 ml 1N NaOH zugefügt. Beide Lösungen wurden anschließend in einen 1 l Messkolben überführt, der mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt wurde. Die Stammlösung wurde in Portionen zu 20 ml tiefgefroren und vor Gebrauch jeweils wieder aufgetaut.

Der fertige KRHA-Puffer bestand aus den folgenden Aliquoten der Stammlösungen:

|                      |   |  |
|----------------------|---|--|
| 200 ml Stammlösung 1 | entsprechend einer Endkonzentration von | 118 mM NaCl                                |
| 8 ml Stammlösung 2   | entsprechend einer Endkonzentration von | 4,7 mM KCl                                 |
| 6 ml Stammlösung 3   | entsprechend einer Endkonzentration von | 2,5 mM $\text{CaCl}_2$                     |
| 2 ml Stammlösung 4   | entsprechend einer Endkonzentration von | 1,2 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$            |
| 2 ml Stammlösung 5   | entsprechend einer Endkonzentration von | 1,2 mM $\text{MgSO}_4$                     |
| 34 ml Stammlösung 6  | entsprechend einer Endkonzentration von | 20,2 mM $\text{NaHCO}_3$                   |
| 8 ml Stammlösung 7   | entsprechend einer Endkonzentration von | 4,7 mM NaOH,<br>10 mM HEPES, 0,2 % Albumin |

Glucose wurde entsprechend der gewünschten Endkonzentration eingewogen.

### 3.2.2 Durchführung der Perifusion

Zur Durchführung der Perifusionen wurde eine Modifikation des 1977 von PANTEN et al. beschriebenen Mikroperifusionssystems benutzt. Der Perifusionsapparat (s. Abbildung 3.1) wurde mindestens 90 Minuten vor Beginn des Begasens mit Carbogen auf 37 °C vorgeheizt. Damit war nach dem Einbringen der Inseln in die Perifusionskammer – bei geschlossenem System – eine konstante Temperatur von 37 °C während der gesamten Versuchsdauer gewährleistet. Nach Erreichen der Temperatur von 37 °C im Perifusionssystem wurde der Apparat fortlaufend bis zum Ende des Versuchs von Carbogen durchströmt. Die Messzylinder mit den Kontroll- und Test-Lösungen wurden in das Gerät hineingestellt. Vor Versuchsbeginn wurden Kontroll- und Test-Lösungen nochmals für 30 Minuten mit Carbogen begast.

Vor der Isolierung der Inseln wurde die Perifusionskammer vorbereitet: Mit einer Deckglaspinzette wurde ein Filter (SMWP01300, Fa. Millipore) genau in die Rille am Kammerkonus eingelegt, ohne dabei das Filter zu verletzen, ein Silikon-Dichtungsring (SX0001301, Fa. Millipore) aufgelegt und der ableitende Teil der Kammer aufgesteckt, ohne Ring oder Filter zu verschieben. Dann wurde eine 5 ml-Spritze über einen Kunststoffkonus an den Ableitschlauch angeschlossen und die Perifusionskammer mit Hilfe der Spritze luftblasenfrei mit KRHA-Glucose-Puffer (3.2.1) gefüllt. 50 isolierte Inseln wurden in die vorbereitete Kammer pipettiert und sanken auf das Filter, ohne dass Luftblasen entstanden.

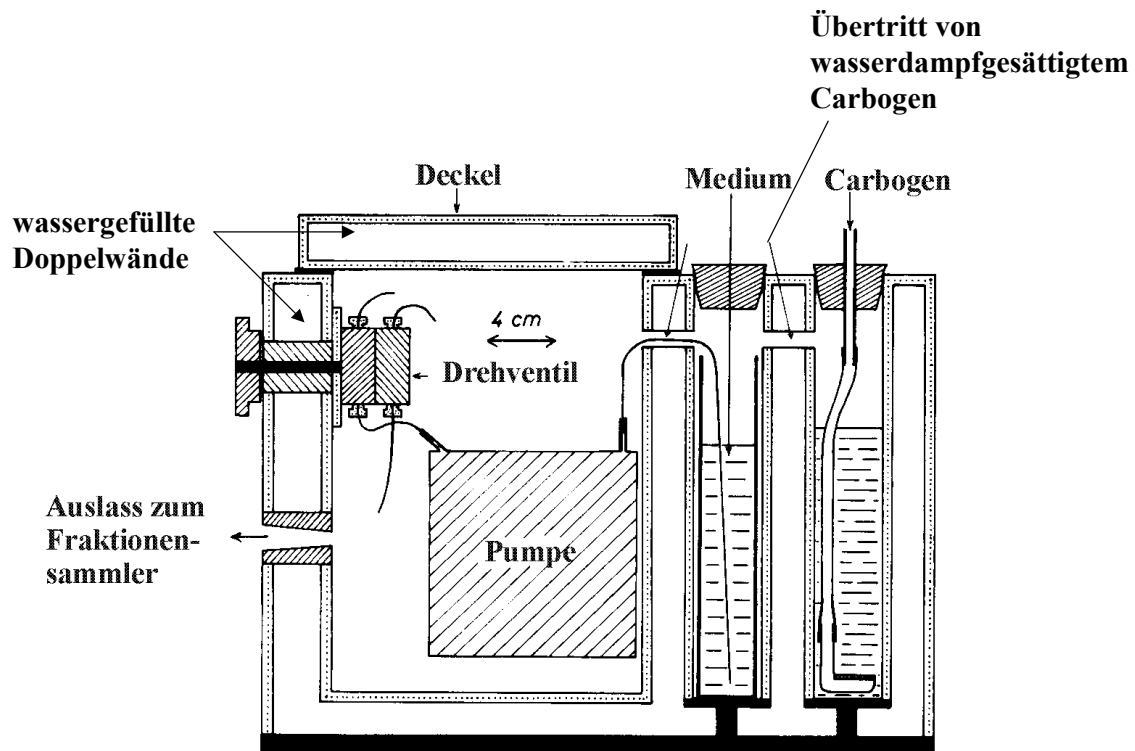
Der zur Perifusionskammer führende Schlauch wurde unter Verwendung einer Peristaltik-Pumpe (LKB, Multiperpex) mit Kontrollmedium luftblasenfrei gefüllt und auf die mit den Inseln befüllte Perifusionskammer geschraubt. Diese wurde anschließend im Inneren des Perifusionsapparates mit Klebeband befestigt. Der Ableitschlauch wurde nach Entfernen der 5 ml-Spritze am Fraktionensammler (Cygnet, Fa. Isco, USA) justiert.

Nach dem Einschalten der Pumpe wurden die Inseln in der Kammer vom Kontrollmedium umströmt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1,0 ml/min. Das Perifusat der ersten 20 Minuten (später der ersten 40 Minuten) wurde verworfen. Das Perifusat der folgenden 40 Minuten wurde in 5 Fraktionen von je 8 Minuten Dauer (entsprechend 8 ml Volumen) gesammelt. Beim Wechsel auf die 6. Fraktion, d.h. nach 60 minütiger (später 80 minütiger) Perifusion wurde der zur Perifusionskammer führende Schlauch in den Messzylinder mit dem zweiten Medium umgehängt. Während dieser Phase wurden zunächst 5 Fraktionen von je 2 Minuten Dauer gesammelt, anschließend 4 Fraktionen zu je 5 Minuten. Danach wurde der Schlauch, wenn es das Versuchsprotokoll vorsah, in ein drittes Medium gehängt und erneut zunächst 5 Fraktionen zu je 2 Minuten und anschließend 4 Fraktionen zu je 5 Minuten gesammelt. Dann

wurde der Schlauch in das erste Medium zurückgehängt und 2 Fraktionen zu je 5 Minuten gesammelt. Jeweils 1 ml der insgesamt 25 Fraktionen wurde in Eppendorf-Reagiergefäßen bis zur Verwendung im ELISA-Test tiefgefroren.

### 3.2.3 Reinigung des Perifusionssystems

Nachdem die Perifusionskammer vom Schlauchsystem abgeschraubt und geöffnet worden war, wurde das Filter mit den perifundierten Inseln entfernt und alle Einzelteile der Kammer mit Aqua bidest. gereinigt und danach bei 60 °C getrocknet. Das Schlauchsystem wurde 30 Minuten mit Aqua bidest. durchspült, anschließend durch ebenso langes Durchsaugen von Luft getrocknet. Einmal pro Woche bzw. vor jedem Wechsel der Testsubstanz wurde das Schlauchsystem vor der Spülung mit Aqua bidest. mit Ethanol 70 % gespült. Bei Notwendigkeit wurde der Perifusionsapparat innen und außen mit Ethanol 70 % gereinigt.



**Abbildung 3.1** Modell des Mikroperifusionssystems (Seitenansicht) nach Panten et al. (1977). Das System verfügt über doppelte Wände, die von 37 °C warmen Wasser durchströmt werden. Bei den durchgeführten Versuchen wurde eine von der Abbildung abweichende Anordnung der Pumpe benutzt, die vor die Perifusionskammer (hier nicht dargestellt) geschaltet ist. Für weitere Details s. Text.

### 3.2.4 Bestimmung des Insulingehaltes

Der Insulingehalt der Proben wurde mittels eines enzymatischen Immunoassays (ELISA) bestimmt (Rat Insulin ELISA, Fa. Mercodia, Uppsala, Schweden). Dieser ELISA-Test funktionierte nach dem so genannten Sandwich-Prinzip: Die Mikrotiterplatte enthielt einen monoklonalen Insulinantikörper, an den das Insulin aus der Probe band. Zum Inkubationsansatz wurde ein zweiter monoklonaler Insulinantikörper gegeben, der an eine andere antigene Determinante des Insulinmoleküls band (=„Sandwich“). Dieser zweite Antikörper war mit dem Enzym Peroxidase konjugiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 20° C und einer gleichmäßigen mechanischen Bewegung von 285 Umdrehungen pro Minute wurden ungebundene Anteile des mit Peroxidase konjugierten Antikörpers durch Waschen entfernt. Anschließend wurde das Substrat 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin zum Ansatz pipettiert. Das Substrat wurde durch die antikörpergebundene Peroxidase zu einer gelblichen Verbindung oxidiert. Die Absorption des gebildeten gelben Farbstoffs wurde bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$  bestimmt (Viktor<sup>2</sup>,1420 Multilabel counter, Perkin Elmer). Der Insulingehalt der Proben wurde unter Verwendung der Software GraphPad Prism (GraphPad, San Diego California, USA) durch Aufstellung einer Standardkurve (Polynom zweiten Grades) errechnet. Dazu wurden für jede Mikrotiterplatte Insulinstandards mit 0  $\mu\text{g/l}$ , 0,15  $\mu\text{g/l}$ , 0,40  $\mu\text{g/l}$ , 1,00  $\mu\text{g/l}$  und 5,50  $\mu\text{g/l}$  parallel mit den Proben inkubiert. Die Messung der Insulinstandards erfolgte als Doppelbestimmung. Proben, die mehr als 5,5  $\mu\text{g/l}$  Insulin enthielten, wurden mit Nullstandard verdünnt. Keine der eingesetzten Testsubstanzen beeinflusste die Insulinmessung.

### 3.2.5 Datenauswertung

Die erhaltenen Insulinkonzentrationen mit der Einheit [ $\mu\text{g/l}$ ] wurden unter Verwendung der Flussgeschwindigkeit (1 ml/min) und der Zahl der eingesetzten Inseln in die Sekretionsrate mit der Einheit [pg/min\*Insel] umgerechnet.

Die Ergebnisse sind angegeben als arithmetische Mittelwerte der freigesetzten Insulinmengen in pg/min\*Insel  $\pm$  SEM für N unabhängige Experimente in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten.

### 3.3 Patch-Clamp-Versuche

#### 3.3.1 Verwendete Lösungen und Materialien

##### 3.3.1.1 Extrazelluläre Lösung (EZ):

Für ein Endvolumen von 2 Litern wurden

|           |  |          |
|-----------|--|----------|
| 16,360 g  | NaCl (Roth, $M_r = 58,44$ g/mol)                                     | (140 mM) |
| 835,00 mg | KCl (Merck, $M_r = 74,55$ g/mol)                                     | (5,6 mM) |
| 488,00 mg | MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O (Merck, $M_r = 203,3$ g/mol)  | (1,2 mM) |
| 764,60 mg | CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (Merck, $M_r = 147,02$ g/mol) | (2,6 mM) |
| 4,766 g   | HEPES (Roth, $M_r = 238,31$ g/mol)                                   | (10 mM)  |

in Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert mit 1N NaOH auf 7,4 eingestellt.

Für Messungen in der whole-cell Konfiguration wurden in diesen Ansatz zusätzlich

|         |  |        |
|---------|--|--------|
| 1,982 g | D-Glucose-Monohydrat (Merck, $M_r = 198,17$ g/mol) | (5 mM) |
|---------|--|--------|

eingewogen.

##### 3.3.1.2 Extrazelluläre Lösung für Gewebeschnitte (SPEIER, 2003):

Für ein Endvolumen von 2 l wurden

|                |  |                 |
|----------------|--|-----------------|
| <b>14,61 g</b> | <b>NaCl (Roth, <math>M_r = 58,44</math> g/mol)</b>                   | <b>(125 mM)</b> |
| 372,8 mg       | KCl (Merck, $M_r = 74,55$ g/mol)                                     | (2,5 mM)        |
| 4,37 g         | NaHCO <sub>3</sub> (Merck, $M_r = 84,01$ g/mol)                      | (26 mM)         |
| 345,0 mg       | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck, $M_r = 137,99$ g/mol)       | (1,25 mM)       |
| 0,44 g         | NaPyruvat (Merck, $M_r = 110,05$ g/mol)                              | (2 mM)          |
| 176,1 mg       | Ascorbinsäure (Merck, $M_r = 176,13$ g/mol)                          | (0,5 mM)        |
| 1,08 g         | myo-Inositol (Sigma, $M_r = 180,02$ g/mol)                           | (3 mM)          |
| 1,08 g         | Milchsäure (Merck, $M_r = 90,08$ g/mol)                              | (6 mM)          |
| 0,41 g         | MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O (Merck, $M_r = 203,3$ g/mol)  | (1 mM)          |
| 0,59 g         | CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (Merck, $M_r = 147,02$ g/mol) | (2 mM)          |
| 1,19 g         | D-Glucose-Monohydrat (Merck, $M_r = 198,17$ g/mol)                   | (3 mM)          |

in Aqua bidest. gelöst. Vor Verwendung wurde die Lösung mindestens 30 Minuten mit Carbogen begast. Auch während der Versuchsdurchführung erfolgte eine kontinuierliche Begasung mit Carbogen.



### 3.3.1.3 Pipettenlösung für die cell-attached Konfiguration:

Für ein Endvolumen von 100 ml wurden

|           |  |          |
|-----------|--|----------|
| 1,089 g   | KCl (Merck, $M_r = 74,55$ g/mol)                                     | (146 mM) |
| 24,40 mg  | MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O (Merck, $M_r = 203,3$ g/mol)  | (1,2 mM) |
| 38,20 mg  | CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (Merck, $M_r = 147,02$ g/mol) | (2,6 mM) |
| 238,30 mg | HEPES (Roth, $M_r = 238,31$ g/mol)                                   | (10 mM)  |

in Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert mit 1N KOH auf 7,4 eingestellt.

### 3.3.1.4 Pipettenlösung für die whole-cell Konfiguration:

Für ein Endvolumen von 50 ml wurden

|           |   |          |
|-----------|---|----------|
| 522,00 mg | KCl (Merck, $M_r = 74,55$ g/mol)  | (140 mM) |
| 10,17 mg  | MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, $M_r = 203,3$ g/mol) | (1 mM)   |
| 14,70 mg  | CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (Merck, $M_r = 147,02$ g/mol)    | (2 mM)   |
| 190,20 mg | EGTA (Sigma, $M_r = 380,4$ g/mol)                                       | (10 mM)  |
| 59,58 mg  | HEPES (Roth, $M_r = 238,31$ g/mol)                                      | (5 mM)   |

in Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert mit 1N KOH auf 7,15 eingestellt.

### 3.3.1.5 Pipettenlösung für die perforated-patch Konfiguration

Für ein Endvolumen von 100 ml wurden nach SMITH et al., 1990:

|           |   |         |
|-----------|---|---------|
| 74,00 mg  | KCl (Merck, $M_r = 74,55$ g/mol)                                    | (10 mM) |
| 58,44 mg  | NaCl (Roth, $M_r = 58,44$ g/mol)                                    | (10 mM) |
| 1,220 g   | K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Merck, $M_r = 174,3$ g/mol)         | (70 mM) |
| 142,31 mg | MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O (Merck, $M_r = 203,3$ g/mol) | (7 mM)  |
| 119,16 mg | HEPES (Roth, $M_r = 238,31$ g/mol)                                  | (5 mM)  |

in Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert mit 1N KOH auf 7,35 eingestellt.

Diese Lösung wurde für das Füllen der Pipettenspitze, sogenanntes tip-filling, verwendet.

Vom stumpfen Ende her wurde Nystatin-haltige Pipetten-Lösung zugegeben, bis ungefähr ein Drittel der Pipette gefüllt war.

Für die Nystatin-haltige Pipetten-Lösung wurden

5 mg Nystatin-Dihydrat ( $M_r = 962,10$  g/mol, Fluka) in 1 ml DMSO (p. a., Merck) gelöst.

Diese Stammlösung wurde jeden Tag frisch hergestellt und während des Versuchtages lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Von dieser Stammlösung wurden 40  $\mu$ l zu 1,96 ml Pipettenlösung für perforated-patch Konfiguration gegeben. Anschließend wurde dieser Ansatz mit einem Sonifier (Sonifier B12, Branson Sonic Power Company), dessen output control auf 7 und dessen timer auf hold eingestellt waren, für 20 Sekunden im Eisbad ultrabeschallt. Die so behandelte Pipettenlösung wurde auf Eis gelagert und 1 bis 2 Stunden verwendet. Danach wurden während des Versuchtages erneut 40  $\mu$ l der Stammlösung wie beschrieben verdünnt.

#### 3.3.1.6 Patch-Pipetten

Die Kapillaren für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden aus Borsilikatglas (Firma Hilgenberg,  $D_a = 2,0$  mm,  $D_i = 1,4$  mm) von 1 m Länge mit einem Diamantschneider in 7,5 cm lange Stücke geschnitten. Die Schnittkanten wurden durch Erwärmen über einem Bunsenbrenner abgerundet, damit die Kapillaren beim Einsetzen in den Pipettenhalter die Silberchloridschicht der Messelektrode möglichst wenig beschädigten. Die zurechtgeschnittenen Kapillaren wurden mit einem vertikalem Pipettenziehgerät (L/M-3P-A, List-Medical-Electronic, Darmstadt) in zwei Schritten zu Pipetten ausgezogen. Für die Versuche an Pankreas-Schnitten wurden Kapillaren aus Borosilikatglas mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm, einem Innendurchmesser von 0,86 mm und einer Länge von 7,5 cm (Harvard Apparatus, GC150F-7.5) verwendet und zu zwei Patch-Pipetten verarbeitet. Dazu wurden die Kapillaren so in die Halterung des Pipettenziehgerätes eingespannt, dass sich ihre Mitte im Zentrum eines zur Spirale gedrehten Platin-Iridium-Heizfilaments befand. Die Erwärmung des Heizdrahts beim ersten Zug (Zuglänge 7 mm) bestimmte die Verjüngung der Pipettenspitze und die Erwärmung des Heizdrahts im zweiten Zug (Zuglänge 12,8 mm) bestimmte den Durchmesser der Pipettenspitze. Je höher die Temperatur des Heizdrahtes ist, umso steiler wird die Verjüngung der Pipettenspitze durch den ersten Zug und umso geringer wird der Durchmesser der Pipettenspitze im zweiten Zug. Ein geringer Pipettendurchmesser bewirkt einen hohen Widerstand der mit Elektrolyt-Lösung gefüllten Pipette, wenn diese in

die Bad-Lösung eintaucht. Die Widerstände der eingesetzten Pipetten lagen zwischen 3 und 7 M $\Omega$ . Anschließend wurden die Pipettenspitzen unter Sichtkontrolle mit einem inversen Mikroskop (Nikon TMS, Objektiv 40/0,55 LWD Ph 3 DL) mit Hilfe einer Microforge (CPM-2 Coating/Polishing microforge, Scientific Instruments, New York, USA), durch deren Platin-Iridium-Draht (Degussa) ein Strom von 2,12 A floss, hitzepoliert, indem die Pipettenspitze nah an den Draht herangebracht wurde. So hergestellte Pipetten wurden bis zu 6 Stunden nach Herstellung verwendet.

#### *3.3.1.7 Agarbrücken*

1-1,5 g Agar-Agar wurden in 50 ml 3 M KCl-Lösung gegeben und im Wasserbad auf 80°C erwärmt, bis der Agar sich vollständig gelöst hatte. Mit dieser Lösung wurden die Glas-Brücken luftblasenfrei gefüllt. Die Glasbrücken mit dem erstarrten Agar wurden in 150 mM KCl-Lösung bei 2 – 8°C gelagert. Während der Messungen wurde die Aussparung der Glasbrücke mit 150 mM KCl-Lösung gefüllt und die Bezugs-Elektrode hier eingesetzt.

#### *3.3.1.8 Elektroden*

Als Mess- und als Bezugs-Elektrode dienten chlorierte Silberdrähte. Die Chlorierung erfolgte indem ein Silberdraht an die Anode einer 9 Volt Batterie angeschlossen wurde. Die Kathode wurde mit einem Platin-Iridium-Draht verbunden. Beide Drähte tauchten in eine 1 M KCl-Lösung ein. Der Silberdraht wurde oxidiert und es schied sich Silberchlorid auf der Oberfläche ab. Durch die gleichzeitige Anwesenheit von elementaren Silber und Silberchlorid können chlorierte Silberdrähte für Strom- und Potentialmessungen verwendet werden. Intakte Silber/Silberchlorid-Elektroden besitzen den Vorteil einer geringen Polarisierung und gut vorhersehbarer Junction potentiale (The Axon Guide, Chapter 1, 1993). Junction Potentiale entstehen immer dann, wenn verschiedene elektrische Leiter in Kontakt treten.

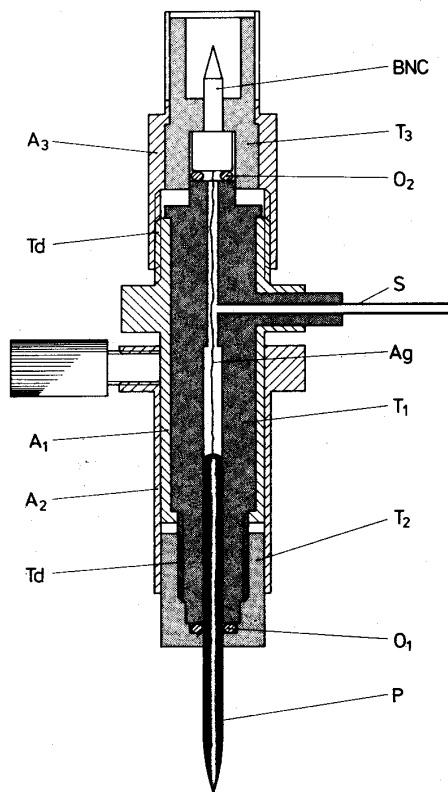
### 3.3.2 Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik dient zur Registrierung elektrischer Ereignisse an lebenden Zellen. Nach Inkubation der isolierten B-Zellen unter den oben angegebenen Bedingungen und Ersatz des RPMI-Mediums der Zellkultur durch filtrierte extrazelluläre Lösung (Filtropur S plus 0,2, Sarstedt) wurde in die 35 mm Petrischalen ein ringförmiger, konischer Plastik-Einsatz mit je einer Aussparung für den Bad-Zulauf und für die Agarbrücke der Bezugselektrode eingesetzt. Anschließend wurden die Petrischalen in die Halterung eines speziell angefertigten Tisches, der über die Objektive des inversen Mikroskops (Axiovert 135, Zeiss) reichte, überführt. Dann wurden die Agarbrücke mit der Bezugselektrode und die Polyethylenschläuche des Zulaufs und der Absaugung in der Petrischale justiert.

Das Mikroskop ist auf einem druckluftgedämpften Tisch (LT-100/80-A4SISA, Barry Controls) aufgestellt, um äußere Schwingungen zu minimieren. Die Petrischalen wurden kontinuierlich mit frischer Elektrolytlösung perfundiert. Der Zulauf wurde durch hydrostatischen Druck gewährleistet, indem Bechergläser über das Höhenniveau des Bades aufgestellt wurden und Polyethylenschläuche mit zwischengeschalteten Glastropfkammern mit einem 4-Wege-Hahn (Stämpfli-Hahn) verbunden waren. Durch den Stämpfli-Hahn konnte der Zulauf zum Bad reguliert werden. Die Absaugung der Badflüssigkeit erfolgte über einen weiteren Polyethylenschlauch mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe und einer dazwischengeschalteten Vakuumflasche. In den Polyethylenschlauch der Absaugung war ein Silberdraht eingeführt, der durch die entstehenden Kapillarkräfte eine gleichmäßige und kontinuierliche Flüssigkeitsabnahme bewirken sollte. Es handelte sich um ein langsames Perfusions-System. Als Zeitpunkt des Lösungswechsels wurde der Zufluss des ersten Tropfens des neuen Mediums in das Zellbad festgelegt.

Neu hergestellte Patch-Pipetten wurden mit der für die jeweilige Konfiguration geeigneten Elektrolyt-Lösung, die auch als Pipettenlösung bezeichnet wird, gefüllt, indem sie in ein Gefäß mit filtrierter Pipettenlösung getaucht wurden (tip-filling). Die entstehenden Kapillarkräfte sorgten für eine Füllung der Pipettenspitze. Der Hauptteil der Pipettenlösung wurde nach Filtration (Filtropur S plus 0,2, Sarstedt) vom stumpfen Ende her in die Pipette gefüllt (back-filling). Anschließend konnte die Pipette durch leichtes seitliches Klopfen an die Pipettenwand von eventuell vorhandenen Luftblasen befreit werden. Dann wurde die mit Elektrolytlösung gefüllte Pipette in den Pipetten-Halter des Vorverstärkers (EPC-7, HEKA Elektronik) über die Ableitelektrode eingesetzt. Der Pipettenhalter war über einen Polyethylen-Schlauch mit einem Drei-Wege-Hahn verbunden, so dass an die Pipette ein

leichter Überdruck angelegt werden konnte (s. Abbildung 3.2), bevor die Pipetten in die Bad-Lösung eingetaucht wurden. Der Überdruck sollte verhindern, dass sich Partikel aus der Bad-Lösung vor der Pipetten-Öffnung ablagern, wodurch die spätere Seal-Bildung mit der Cytoplasmamembran erschwert werden könnte. Die Patch-Pipetten wurden unter Verwendung eines ölgefüllten Mikromanipulators (Narishige Japan, Tokyo, Model: MO-103) unter Sichtkontrolle eines 10er Objektivs (Leitz) des inversen Mikroskops (Axiovert 135, Zeiss) über der zu untersuchenden Zelle zentriert. Nach dem Wechsel auf die 40fache Vergrößerung (Zeiss, LD ACHROPLAN; 40x/0,60) wurde die Pipettenspitze an die Zellen herangeführt.



**Abbildung 3.2** Querschnitt durch einen Pipettenhalter. Der Pipettenhalter bietet zwei Grundfunktionen, erstens gewährleistet er elektrische Verbindung zwischen der Pipettenlösung und dem Anschlussstift eines BNC-Steckers, zweitens erlaubt er das Anlegen von Unter- oder Überdruck in das Pipetteninnere. Der Halter besitzt einen Teflonkörper  $T_1$  mit einer zentralen Bohrung, die das genaue Einsetzen einer Patch-Pipette ermöglicht und einen chlorierten Silberdraht, der auf den Anschlussstift des BNC-Steckers gelötet ist. Der BNC-Stecker wird von einem Teflonstück  $T_3$  gehalten. Die Pipette wird durch die Schraubkappe  $T_2$  festgehalten. Der Ausgang  $S$  ist mit einem Silikonschlauch verbunden, um Über- oder Unterdruck an das Pipetteninnere anzulegen. Das Pipetteninnere ist durch die O-Ringe  $O_1$  und  $O_2$  luftdicht verschlossen.  $A_1$  und  $A_3$  sind Aluminium-Schilder für den Teflonkörper;  $A_2$  ist ein Gleitschutz für die Pipette.  $T_d$  bezeichnet das Schraubgewinde (nach HAMILL et al.; 1981).

Anschließend wurde durch Anlegen eines leichten Unterdrucks an den Pipetten-Halter die Cytoplasmamembran der Zelle an die Pipettenöffnung angesaugt, so dass eine effektive Abdichtung entstand. Dieser Vorgang wird auch als Sealbildung bezeichnet. Wenn der Widerstand der Abdichtung hoch genug liegt, ist elektrischer Stromfluss nur noch in dem von der Pipettenöffnung umschlossenen Membranfleck registrierbar. Werden Widerstandswerte im Giga-Ohm-Bereich erreicht, wird von der Bildung eines Gigaseals gesprochen.

In der vorliegenden Arbeit wurde in der cell-attached-, der whole-cell- (HAMILL et al., 1981) und der perforated-patch Konfiguration (HORN und MARTY, 1988) gearbeitet. Die perforated-patch Konfiguration besitzt prinzipiell die gleichen elektrophysiologischen

Eigenschaften wie die konventionelle whole-cell Konfiguration (näheres siehe unten). Es wird die Summe aller Ströme durch die Cytoplasmamembran gemessen und die Registrierung des Membranpotentials ist möglich. Die Bezeichnung „Patch“ könnte vermuten lassen, dass nur Ströme eines begrenzten Membranfleckes registriert werden können, wie es beim excised-Patch (inside-out, outside-out) und Makropatch der Fall ist. Deswegen wäre die Bezeichnung „perforierte whole-cell Konfiguration“ eindeutiger. Da sich aber die Bezeichnung perforated-patch für die „perforierte whole-cell Konfiguration“ etabliert hat, wird diese auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die cell-attached Konfiguration wurde gewählt, um Einzelkanalmessungen durchzuführen. In dieser Konfiguration ist die zu untersuchende Zelle intakt und second messenger und metabolisch wirksame Enzyme können Einfluss auf die Wirkung der untersuchten Substanzen ausüben.

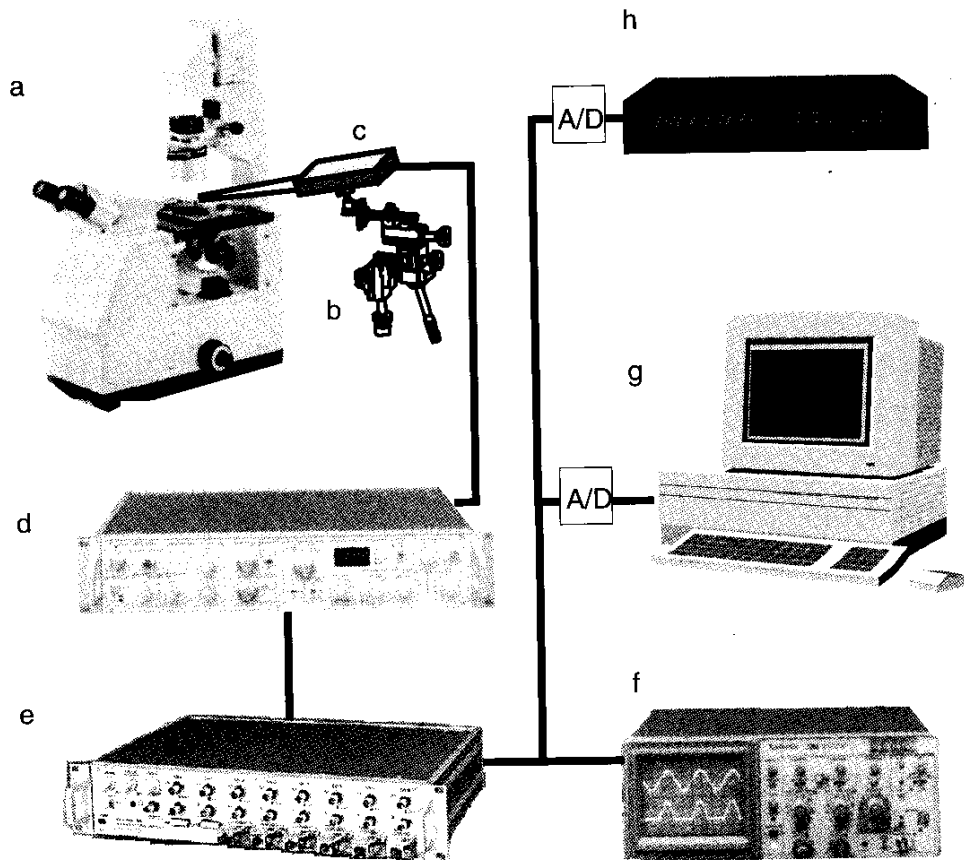
Die whole-cell Konfiguration wurde gewählt, um das Membranpotential der Zellen zu bestimmen und Gesamtströme der Zelle zu registrieren. Dieses ist nur möglich, wenn die Ableitelektrode direkten elektrischen Zugang zum Zellinneren aufweist. In der whole-cell Konfiguration wird der elektrische Zugang durch Ruptur der Zellmembran erreicht. Dadurch kann ein Austausch zwischen Pipettenlösung und Cytosol stattfinden (MARTY und NEHER, 1983).

Die perforated-patch Konfiguration hat gegenüber der konventionellen whole-cell Konfiguration den Vorteil, dass die Zusammensetzung des Cytoplasmas geringfügiger beeinflusst wird (HORN and MARTY, 1988). In der perforated-patch Konfiguration wird der elektrische Zugang zum Zellinneren durch den Einsatz von Stoffen erreicht, die in der Lage sind, Porenbildung in der Cytoplasmamembran zu induzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde das Polyantibiotikum Nystatin eingesetzt. Die durch Nystatin induzierten Poren erlauben keine Passage von Stoffen, deren Molekulargewicht über 200 g/mol liegt (WALZ, 1995). Alle Moleküle, die größer als Glucose sind, werden im Cytoplasma zurückgehalten. Die meisten second-messenger erfüllen dieses Kriterium. Registrierung des Membranpotentials unter Current-Clamp-Bedingungen sowie Registrierungen des Gesamtstroms unter Voltage-Clamp-Bedingungen sind möglich, sobald ein elektrischer Zugang zum Zellinneren besteht. Dieses ist an einer Zunahme der Leitfähigkeit erkennbar.

Zur Registrierung der Ströme wurden ein EPC-7 Patch-Clamp-Verstärker (List-electronic, Darmstadt, Germany), ein PC und pClamp 6.0.3 Software (Axon Instruments, Inc, USA) verwendet. Die registrierten Ströme wurden durch ein aktives Filter (AF 173, Thomatronik,

Rosenheim, Germany) mit 4 poliger Besselcharakteristik gefiltert. Die Daten wurden mit einem Analog-Digital-Wandler (VR-10B, Instrutech Corporation, New York, USA) digitalisiert und auf Videobändern gespeichert. Parallel dazu erfolgte ein Ausdruck mittels eines Schnellschreibers (TA240 Easygraf, Modell 42-8240-10, Gould Instrument Systems) mit integriertem AC/DC-RMS-Verstärker (Modell: 13-6615-20) auf Thermopapier (Gould Teilenummer CL-213688, Gould-Nicolet). Daten der für die jeweilige Fragestellung relevanten Versuchsabschnitte wurden über die Interface-Card (TL-1 DMA Interface, Axon Instruments) analog-digital gewandelt und auf der Festplatte des Rechners gespeichert. Hier standen die Daten zur quantitativen Auswertung zur Verfügung. Zur Auswertung dienten die Programme Fetchan, pStat und Clampfit der pclamp 6.03-Software (Axon Instruments, Inc, USA). Zur statistischen Auswertung und zur weiteren Darstellung der Versuchsergebnisse wurde GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, USA) verwendet.

Zum schematischen Aufbau eines Patch-Clamp-Arbeitsplatzes siehe Abbildung 3.3.



**Abbildung 3.3** Der Patch-Clamp-Meßstand. Die schematische Darstellung zeigt den Aufbau eines typischen Patch-Clamp-Meßstandes mit den häufig vorhandenen Komponenten. Die Grundausstattung besteht aus Mikroskop (a, hier ein inverses), Mikromanipulator (b), Vorverstärker (c), mit dem Pipettenhalter und der Pipette, Patch-Clamp-Verstärker (d), Zwischenverstärker (e), Oszilloskop (f, nützlich aber kein „Muss“), Computer (g) und Datenspeicher (h), zum Beispiel Videorecorder. Die mit A/D bezeichneten Kästchen in der Grafik symbolisieren A/D-Wandler (nach NUMBERGER und DRAGUHN, 1996)



### 3.3.3 Durchführung und Auswertung der Messungen in der cell-attached Konfiguration

Nach Annähern der Patch-Pipette wurde wie oben beschrieben ein Seal hergestellt. Es wurde unter Voltage-Clamp-Bedingungen mit einem Haltepotential von 0 mV gearbeitet. Die Ströme wurden mit 20 mV/pA verstärkt. Nach erfolgreicher Sealbildung konnten Kanal-Öffnungen mit einem durchschnittlichen Stromfluss von 3 bis 4 pA registriert werden. Bei einem Haltepotential von 0 mV entspricht das Membranpotential der Zelle ihrem Ruhemembranpotential. In B-Zellen des Pankreas wird das Ruhemembranpotential vorwiegend durch die Leitfähigkeit des  $K_{ATP}$ -Kanals bestimmt (ASHCROFT und RORSMAN, 1989). Daher werden die beobachteten Kanal-Öffnungen dem  $K_{ATP}$ -Kanal zugerechnet.

Zur Auswertung wurde die relative Offenzeit ( $t_{rel}$ ) des  $K_{ATP}$ - Kanals in repräsentativen Abschnitten des jeweiligen Versuches nach der Halbamplituden-Schwellenwerttechnik (COLQUHOUN und SIGWORTH, 1995) unter Verwendung der Analysenprogramme Fetchan und pStat bestimmt. Zur Bestimmung dieser Größe, die auch relative Kanalaktivität genannt wird, wurde folgende Formel herangezogen:

$$t_{rel} = (\sum t_n [s] * n) / t_{ges} [s]$$

Hierbei ist  $t_n$  die Offenzeit des jeweiligen Levels in Sekunden,  $n$  das jeweilige Level und  $t_{ges}$  die Gesamtzeit des aufgenommenen Versuchsabschnitts in Sekunden. Die unterschiedlichen Levels stehen dafür, ob 1 Kanal oder mehrere Kanäle geöffnet sind. Die Öffnung eines  $K_{ATP}$ -Kanals ist dadurch zu erkennen, dass in der cell-attached Konfiguration bei einem Haltepotential von 0 mV ein Strom von ungefähr 3,5 pA fließt (RORSMAN und TRUBE, 1985). Die Zeit, in denen zwei Kanäle gleichzeitig geöffnet sind, wird verdoppelt. So ist das Ergebnis identisch mit der Situation, wenn diese Kanäle nacheinander öffnen würden.

Da bei cell-attached Versuchen die registrierte Aktivität der einzelnen Zellen davon abhängt, wie viele Kanäle sich in dem umschlossenen Patch befinden und daher schwanken kann, wurden die erhaltenen Werte normalisiert.

Die Aktivität der einzelnen Zellen in extrazellulärer Lösung vor Zugabe der jeweiligen Testsubstanzen wurde gleich 100 % gesetzt. Man erhält damit die prozentuale Offenzeit ( $t_{\%}$ ).

$$t_{\%} = t_{\text{subst}}[\text{s}] / t_{\text{EZ}}[\text{s}] * 100$$

Hierbei ist  $t_{\text{subst}}$  die relative Offenzeit des Kanals in Anwesenheit der Testsubstanz und  $t_{\text{EZ}}$  die relative Offenzeit des Kanals in extrazellulärer Lösung vor Zugabe der Testsubstanz. Abweichungen von dieser Konvention werden angegeben.

### **3.3.4 Durchführung und Auswertung der Messungen in der whole-cell Konfiguration**

Zuerst wurde wie oben beschrieben ein Seal in der cell-attached Konfiguration hergestellt. Anschließend wurde die Verstärkung des Hauptverstärkers von 20 mV/pA auf 2 mV/pA und Stim-Scaling von 0,001 auf - 0,1 erniedrigt. Am Filter wurde das Low-Pass-Potentiometer von 5 auf 10 und der Multiplier von 1k auf 10 kHz verstellt. Es wurde ein Haltepotential von -70 mV vorgegeben und die Pipetten-Kapazität durch Einstellung von  $C_{\text{fast}}$  abgeglichen. Anschließend wurde durch Anlegen eines Unterdrucks, der höher als bei der Sealherstellung war, die Cytoplasmamembran durchbrochen. Dadurch ist die Pipette leitend mit dem Cytosol verbunden. Hierbei liegt zwischen Silber/Silberchloridelektrode und Cytosol ein Widerstand, der als Serienwiderstand bezeichnet wird. Dieser Widerstand ist meistens höher als der reine Pipettenwiderstand, da beim Durchbrechen der Zellmembran Membranbestandteile und manchmal sogar Zellorganellen in den Mündungsbereich der Pipette gezogen werden. Diese erhöhen den Widerstand deutlich gegenüber dem Pipettenwiderstand. Oft wird auch der Kehrwert des Serienwiderstandes, der als Leitfähigkeit mit der Einheit Siemens (S) bezeichnet wird, angegeben (NUMBERGER und DRAGUHN, 1996). Der Serienwiderstand und die Zellkapazität wurden durch Einstellungen von  $G_{\text{series}}$  und  $C_{\text{slow}}$  abgeglichen. Jetzt konnte unter Voltage-Clamp (VC)- und unter Current-Clamp (CC)-Bedingungen gearbeitet werden.

Messungen unter VC-Bedingungen erfolgen bei einem fest vorgegebenen Haltepotential. Wenn Stromfluss durch die Cytoplasmamembran Abweichungen von diesem festeingestellten Potential bewirkt, erzeugt der Patch-Clamp-Verstärker einen Strom, der den Strom durch die Cytoplasmamembran kompensieren kann und damit das Potential konstant hält. Ströme über die Cytoplasmamembran werden also durch die Erzeugung eines quantitativ gleichen Gegenstroms durch den Verstärker sichtbar gemacht. In der whole-cell Konfiguration sind keine Einzelkanäle messbar, sondern es wird der Gesamtstrom durch die

Cytoplasmamembran registriert. Mit Hilfe des Programms Clampex wurde ein Stimulationsprotokoll vorgegeben, in dem ausgehend von dem Haltepotential von  $-70$  mV für jeweils  $200$  ms das Haltepotential um  $+10$  mV und nach einer Pause von  $1060$  ms, in der wieder  $-70$  mV anlagen, um  $-10$  mV verändert wurde. Somit betrug das Haltepotential in diesen Zeiten  $-60$  mV und  $-80$  mV.

Um das Membranpotential der Zellen zu messen wurde der Modusschalter des EPC-7 auf Current-Clamp-(CC) Bedingungen umgestellt. Hierbei wurde der Strom konstant gehalten. Durch Umschaltung auf CC-Bedingungen werden im EPC-7 die  $R_s$ -Kompensation und die Abgleichungen durch  $C_{fast}$  und  $C_{slow}$  außer Kraft gesetzt (SIGWORTH, 1986, S.49).

Zur Auswertung der Gesamtströme und des Membranpotentials wurde das Programm Clampfit verwendet.

Zur Auswertung der Gesamtströme wurden Versuchsabschnitte von  $12,8$  Sekunden auf der Festplatte gespeichert. Diese Versuchsabschnitte umfassen  $5$  runs von jeweils  $2,56$  Sekunden Länge. Bei einem Haltepotential von  $-70$  mV, welches nahe dem Ruhemembranpotential liegt, sollte der Stromfluss nahe Null sein. Die Haltepotentiale betrugen entsprechend dem oben dargestellten Stimulationsprotokoll abwechselnd  $-60$  und  $-80$  mV. Zur Auswertung wurde die Differenz des Stromfluss bei  $-60$  und  $-80$  mV herangezogen. Nachdem alle  $5$  runs durch das Programm Clampfit eingelesen wurden, wurde der Trace-Average gebildet und die Strom-Maxima bei  $-60$  mV und die Strom-Minima bei  $-80$  mV bestimmt. Als Gesamtstromfluss wurde die Differenz ( $I_{Diff}$ ) zwischen diesen Werten festgelegt.

Um die unterschiedlichen elektrischen Aktivitäten der Zellen auszugleichen wurden die Differenzen der Ströme in extrazellulärer Lösung gleich  $100\%$  gesetzt. Die Werte in Gegenwart der Testsubstanzen wurden auf diesen Wert nach folgender Formel normalisiert:

$$I_{Diff\%} = I_{DiffSubst} / I_{DiffEZ} * 100$$

$I_{Diff\%}$  bezeichnet die prozentuale Stromdifferenz,  $I_{DiffSubst}$  bezeichnet die Stromdifferenz zwischen  $-60$  und  $-80$  mV in Gegenwart der Testsubstanz,  $I_{DiffEZ}$  bezeichnet die Stromdifferenz zwischen  $-60$  und  $-80$  mV in extrazellulärer Lösung.

Folgende Funktion wurde zur Analyse der Beziehung zwischen Substanzkonzentration und Kanalaktivität verwendet:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{Hill Slope}))}$$

Y ist die gemessene Stromantwort; sie verläuft vom Strommaximum in Abwesenheit von Testsubstanzen (= Top) in einem sigmoidalen Verlauf zu dem durch die Testsubstanzen nicht zu hemmenden Grundstrom (= Bottom);

EC50 ist die halbmaximal wirksame Konzentration der untersuchten Substanzen;

X ist der Logarithmus der eingesetzten Konzentration;

Hill Slope bezeichnet den Hillkoeffizienten, der die Steigung der Kurve angibt.

Für die Bestimmung des Membranpotentials wurden Versuchsabschnitte von 10 Sekunden von der Festplatte in das Programm Clampfit eingelesen. Der horizontalen Cursor wurde in die horizontale Mitte der eingelesenen Registrierung gelegt und der entsprechende Wert des Membranpotentials abgelesen. Traten während des Versuchsabschnitts Aktionspotentiale auf, wurde jeweils für das Plateau und die Spitze des Aktionspotentials wie oben angegeben ein Wert bestimmt.

### **3.3.5 Durchführung und Auswertung der Messungen in der perforated-patch Konfiguration**

Die hitzepolierten Pipetten wurden zunächst durch Eintauchen der Pipettenspitze in Nystatin-freie Pipettenlösung für perforated-patch Konfiguration (3.3.1.5) gefüllt. Anschließend wurde aus einer 2 ml Spritze durch einen Filter (Filtropur S plus 0,2, Sarstedt) die Nystatin-haltige Pipettenlösung vom stumpfen Ende her in die Pipette eingefüllt. Anschließend erfolgte wie oben beschrieben die Herstellung eines Seals in der cell-attached Konfiguration. Nach Ausbildung eines Seals wurde angesichts der Lichtempfindlichkeit des Nystatins das Mikroskoplicht ausgestellt. Die Verstärkung wurde am EPC-7 von 20 mV/pA auf 2 mV/pA und das Stim-Scaling von 0,001 auf - 0,1 erniedrigt. Am Filter wurde das Low-Pass-Potentiometer von 5 auf 10 und der Multiplier von 1k auf 10 kHz verstellt. Dann wurde ein Haltepotential von -70 mV eingestellt. Die Pipetten-Kapazität wird durch Einstellung von  $C_{\text{fast}}$  abgeglichen. Es wurde die Stromantwort auf den Testpuls beobachtet.

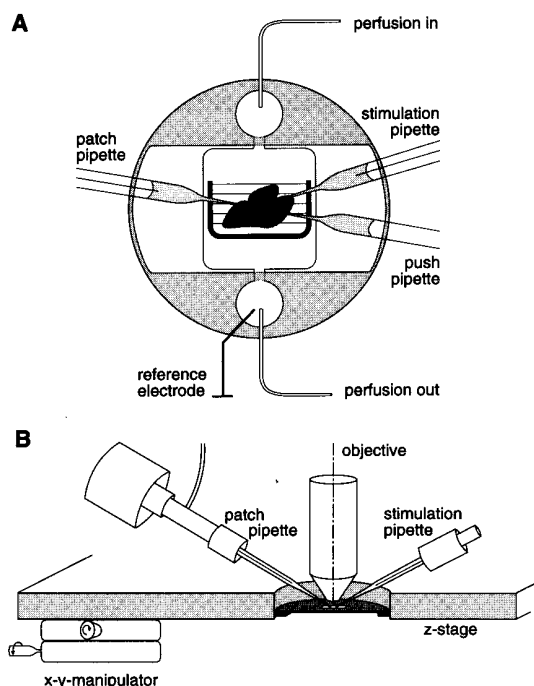
Während das Nystatin in den von der Pipette umschlossenen Membranausschnitt diffundiert und Poren bildet, wurde die Ausbildung des elektrischen Zugangs zum Zellinneren durch die Zunahme der kapazitiven Ströme angezeigt. Eine Zunahme der kapazitiven Ströme ging mit der Möglichkeit einher, die Zell-Kapazität mit  $C_{\text{slow}}$  und die Leitfähigkeit mit  $G_{\text{series}}$

abzugleichen. Wenn eine Zunahme der kapazitiven Ströme beobachtet wurde und ein Abgleichen von Zellkapazität und Leitfähigkeit möglich war, wurde das Membranpotential unter Current-Clamp Bedingungen gemessen. Bis hierher vergingen nach Sealbildung durchschnittlich 10 Minuten. Die gemessene Zellkapazität betrug zu Versuchsbeginn durchschnittlich 2,3 pF, die durchschnittliche Leitfähigkeit lag bei 0,04  $\mu$ S. Die Leitfähigkeit wird durch die Anzahl und Größe der durch Nystatin generierten Poren bestimmt. Je mehr Poren ausgebildet wurden, umso größer war die registrierte Leitfähigkeit. Die Zugabe der Testsubstanzen erfolgte, wenn die Zelle ein Ruhemembranpotential von -60 mV oder geringer aufwies.

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programms Clampfit wie in der Auswertung der whole-cell-Versuche unter Current-Clamp Bedingungen beschrieben.

### 3.3.6 Durchführung und Auswertung der elektrophysiologischen Versuche an Pankreasschnitten

Beim Arbeiten mit Pankreasschnitten unterschied sich der Aufbau des Arbeitsplatzes durch die Verwendung eines aufrechten Mikroskops (Axioskop FS, Zeiss). Anders als die üblichen aufrechten Mikroskope verfügt dieses über einen festen Objektisch und die Fokussierung erfolgt über Bewegung der oberen Hälfte des Mikroskopstativs. Diese Anordnung gewährleistet die größtmögliche Stabilität bei elektrophysiologischen Untersuchungen. Das Mikroskop war auf einem schwingungsfreien Tisch (LW303BV-OPT, Newport) aufgestellt und mit einer Kamera (TK-1070E, JVC) ausgestattet. Dadurch konnten Aufnahmen der Gewebeschnitte angefertigt werden. Die Ströme wurden mit Hilfe des Patch-Clamp-Verstärkers SWAM IIc (Celica, Slowenien) registriert. Der Lösungswechsel erfolgte mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Minipuls2, Gilson). Die Gewebeschnitte wurden in eine extra angefertigte Perifusionskammer, an der auch die Agarbrücke befestigt wurde, überführt und mit einem U-förmigen Platinblech, über welches Nylonfäden gespannt waren, festgehalten (s. Abbildung 3.4). Es wurde mit der von John Dempster entwickelten Software WinWCP und WinEDR (John Demster, Department of Physiology & Pharmacology, University of Strathclyde, UK) gearbeitet. Als Analog Digital Wandler wurde die PCI-1200 Karte von National Instruments und das BNC-Connector Board BNC 2081 (National Instruments) verwendet. Die Pipette wurde von einem Pipettenhalter der Firma WPI gehalten und mit Hilfe des wassergefüllten Mikromanipulators MHW-3 (Narishige) positioniert. Nach erfolgter Sealherstellung wurde in der whole-cell Konfiguration gearbeitet.



**Abbildung 3.4**

**A:** Schematische Darstellung einer Perifusionskammer, in der ein Gewebeschnitt mit einem Platin-U festgehalten wird.

**B:** Seitliche Ansicht auf die Perifusionskammer mit Patch-Pipette (nach PLANT, EILERS und KONNERTH, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde ohne Stimulationspipette und push-Pipette gearbeitet.

### 3.4 Lösungen der Testsubstanzen

Die Testlösungen wurden aus Stammlösungen der jeweiligen Substanzen durch Verdünnen mit KRHA-Puffer für Perfusionversuche (3.2.1) und durch Verdünnen mit extrazellulärer Lösung für Patch-Clamp Versuche (3.3.1.1 und 3.3.1.2) erhalten. Die Stammlösungen wurden bei 2°C bis 8°C gelagert und bis zu 4 Wochen lang verwendet. Die Glucose-Konzentrationen des KRHA-Puffers und der extrazellulären Lösung betrugen 5 oder 10 mM. Für Patch-Clamp-Messungen in der cell-attached Konfiguration wurde extrazelluläre Lösung ohne Glucose verwendet. Obwohl in der cell-attached Konfiguration möglichst physiologienahe Bedingungen geschaffen werden sollten, war dieser Verzicht auf Glucose notwendig, damit das Öffnungsverhalten der  $K_{ATP}$ -Kanäle beobachtet werden konnte. Die Anwesenheit von Glucose würde die  $K_{ATP}$ -Kanäle schließen, so dass keine Effekte von  $K_{ATP}$ -Kanal blockierenden Substanzen untersucht werden könnten.

#### 3.4.1 Imidazoline und Analoga

##### 3.4.1.1 Alinidin

Für eine 10 mM Alinidin-Stammlösung (Boehringer Ingelheim, ST 0567BR,  $M_r=351,076$  g/mol) wurden 8,78 mg Alinidin in 2,5 ml DMSO gelöst.

##### 3.4.1.2 Efaroxan

Für eine 10 mM Efaroxan-Stammlösung wurden 12,65 mg Efaroxan (RBI, Natick, Mass.,USA,  $M_r=252,74$  g/mol) in 5 ml Aqua bidest. gelöst.

##### 3.4.1.3 KU14R

Für eine 100 mM Stammlösung wurden 5,36 mg KU14R (Tocris,  $M_r=214,26$  g/mol) in 250  $\mu$ l DMSO (p.a., Merck) gelöst.

Die Konzentration des DMSO soll in den Endverdünnungen unter 0,1% liegen. Daher wurde für Untersuchungen mit KU14R-Konzentrationen über 100  $\mu$ M eine 300 mM Stammlösung hergestellt.

Für eine 300 mM KU14R-Stammlösung wurden 16,07 mg KU14R in 250  $\mu$ L DMSO gelöst.

##### 3.4.1.4 Phentolamin

Für eine 10 mM Stammlösung wurden 37,75 mg Phentolamin (Ciba-Geigy, Lörrach, Germany,  $M_r=377,5$  g/mol) in 10 ml Aqua bidest. gelöst.

#### 3.4.1.5 RX871024

Für eine 100 mM Stammlösung wurden 7,45 mg RX871024 (Lilly,  $M_r = 297,8$  g/mol) in 250  $\mu$ l DMSO (p.a., Merck) gelöst.

### 3.4.2 Sulfonylharnstoffe

#### 3.4.2.1 Tolbutamid

Für eine 50 mM Tolbutamid-Stammlösung wurden 6,76 mg Tolbutamid (Serva, Feinbiochemica Heidelberg,  $M_r = 270,3$ ) in 0,5 ml 0,1 N- NaOH gelöst.

### 3.4.3 Andere Substanzklassen

#### 3.4.3.1 Glucose

Für Perifusionsversuche wurden für eine 10 mM Glucose-Lösung 99,1 mg und für eine 5 mM Glucose-Lösung 99,1 mg D-Glucose-Monohydrat (Merck,  $M_r = 198,17$  g/mol) in 100 ml KRHA-Puffer gelöst.

Für Patch-Clamp-Experimente wurden für eine 10 mM Glucose-Lösung 990,9 mg D-Glucose-Monohydrat (Merck,  $M_r = 198,17$  g/mol) in 500 ml glucosefreier EZ (3.3.1.1) gelöst.

#### 3.4.3.2 40 mM Kaliumchloridlösung

Um Isotonie der eingesetzten Lösungen bei Durchführung der Patch-Clamp-Experimente zu gewährleisten, wurde auf Grundlage der Zusammensetzung der extrazellulären Lösung der Kaliumchlorid-Anteil auf insgesamt 40 mM erhöht und der Anteil an Natriumchlorid auf 105,6 mM erniedrigt.

Für 100 ml Lösung wurden

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 671,13 mg | NaCl (Roth, $M_r = 58,44$ g/mol)                                     | (105,6 mM) |
| 298,24 mg | KCl (Merck, $M_r = 74,55$ g/mol)                                     | (40 mM)    |
| 24,42 mg  | MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O (Merck, $M_r = 203,3$ g/mol)  | (1,2 mM)   |
| 38,25 mg  | CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (Merck, $M_r = 147,02$ g/mol) | (2,6 mM)   |
| 240 mg    | HEPES (Roth, $M_r = 238,31$ g/mol)                                   | (10 mM)    |
| 99,1 mg   | D-Glucose-Monohydrat (Merck, $M_r = 198,17$ g/mol)                   | (5 mM)     |

in Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert mit 1N NaOH auf 7,4 eingestellt.



#### 3.4.3.3 *Natriumcyanid*

Für eine 100 mM Stammlösung wurden 49,01 mg Natriumcyanid (Fluka) in 10 ml Aqua bidest. gelöst.

### 3.5 Statistik

Die Ergebnisse sind jeweils angegeben als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM für N unabhängige Experimente. Signifikanzen wurden unter Verwendung des zweiseitigen t-Tests oder des zweiseitigen t-Tests mit Welch-Korrektur berechnet.  $P < 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

## **4 Ergebnisse**

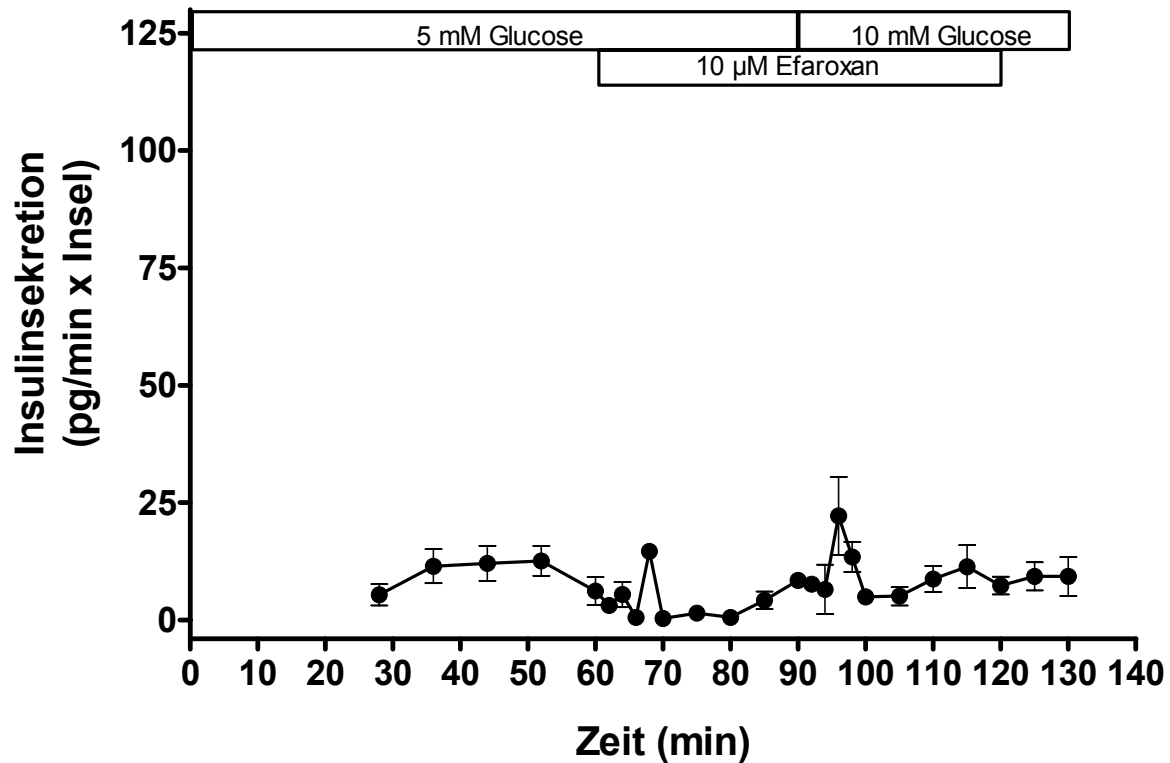
### **4.1 Untersuchungen zur Glucoseselektivität von Imidazolinen der ersten Generation**

Als Glucoseselektivität wird die Fähigkeit von insulinsekretionssteigernden Pharmaka definiert, die Insulinsekretion isolierter Pankreas-Inseln nur dann zu steigern, wenn Glucose-Konzentrationen im Medium vorliegen, die eine eigene stimulatorische Wirkung auf die Sekretion ausüben. Damit sind glucoseselektive Pharmaka nicht Stimulatoren, sondern Verstärker der Insulinsekretion. Diese Fähigkeit ist von zentraler Bedeutung für die mögliche therapeutische Anwendung.

#### **4.1.1 Konzentrationsabhängigkeit der insulinsekretionssteigernden Wirkung von Efaroxan**

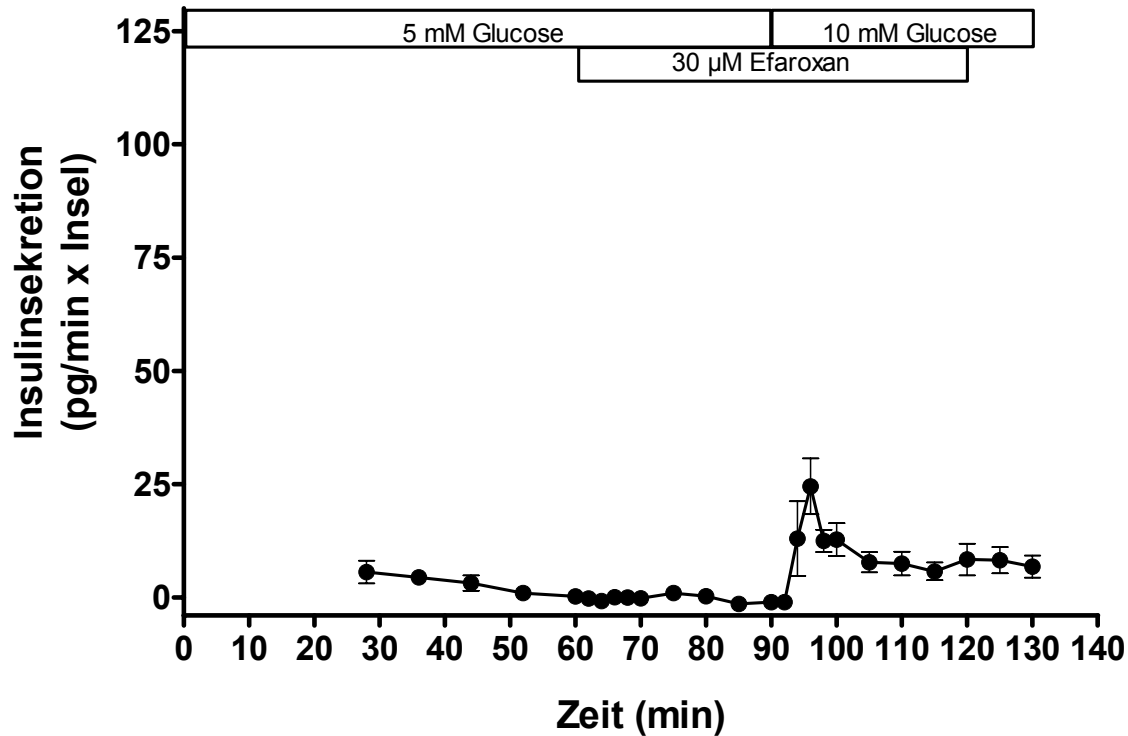
Um die glucoseabhängige Steigerung der Insulinsekretion durch Imidazoline zu charakterisieren, erfolgte während der Messung der Insulinsekretion ein Wechsel von 5 auf 10 mM Glucose. 5 mM Glucose bewirken für sich an Langerhans'schen Inseln der Maus noch keine Steigerung der Insulinsekretion und bei 10 mM Glucose setzt die Steigerung der Insulinsekretion gerade eben ein.

In der vorliegenden Arbeit konnte für Efaroxan eine glucoseselektive Steigerung der Insulinsekretion isolierter Inseln nachgewiesen werden. Wurden 10  $\mu$ M Efaroxan zu einem Medium mit 5 mM Glucose hinzugegeben, mit welchem isolierte Inseln umströmt wurden, so war keine Steigerung der Sekretionsrate zu verzeichnen. Die Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM hob die Sekretionsrate in Gegenwart von 10  $\mu$ M Efaroxan nach 6 Minuten von 8,5 pg Insulin/min·Insel auf ein Maximum von 22,2 pg Insulin/min·Insel an. Danach sank die Sekretionsrate innerhalb von 4 Minuten wieder auf Plateauwerte zwischen 5 bis 9 pg Insulin/min·Insel, die den Basalsekretionswerten entsprachen, ab. Die Wegnahme der Testsubstanz bei Minute 120 veränderte die Sekretionsrate nicht (s. Abbildung 4.1).

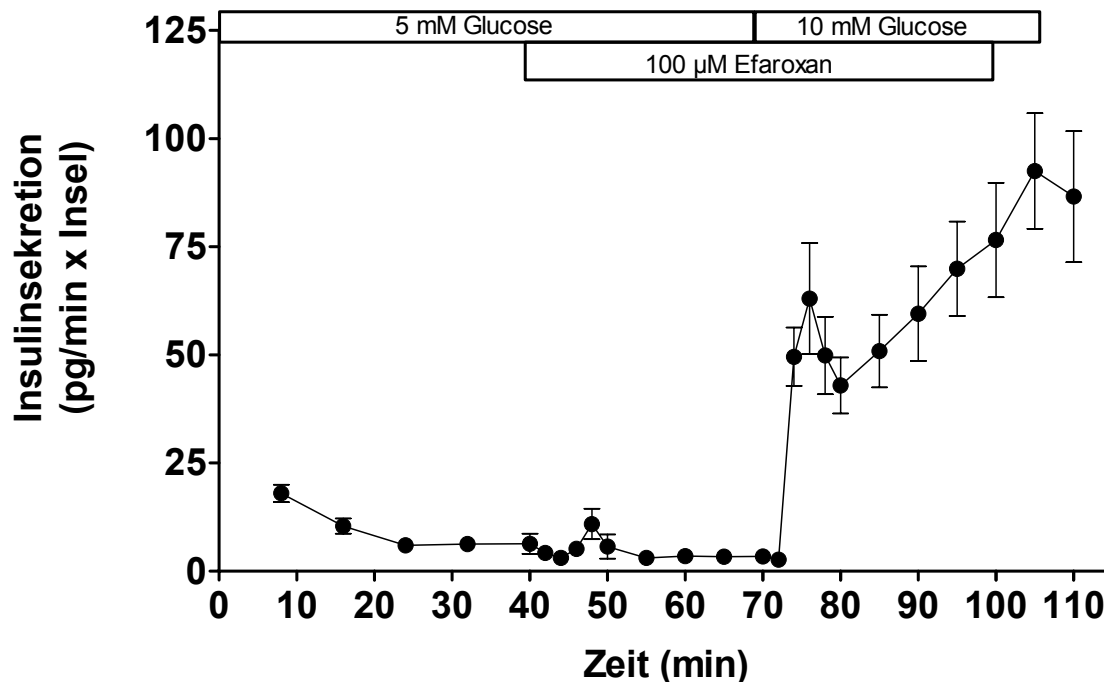


**Abbildung 4.1** Glucoseabhängiger Effekt von 10  $\mu\text{M}$  Efaroxan auf die Insulinsekretion. Frisch isolierte Pankreas-Inseln der Maus wurden mit Krebs-Ringer-Medium, das bis zu Minute 90 5 mM Glucose und von Minute 90 bis Minute 130 10 mM Glucose enthielt, umströmt. Von Minute 60 bis Minute 120 waren 10  $\mu\text{M}$  Efaroxan anwesend. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 Versuchen.

Die Sekretionskurve von 30  $\mu\text{M}$  Efaroxan zeigte, dass 30  $\mu\text{M}$  Efaroxan in Gegenwart von 5 mM Glucose die Basalsekretionswerte nicht veränderte (s. Abbildung 4.2). Erst die Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM Glucose bei Minute 90 führte innerhalb von 6 Minuten auf einen Spitzenwert von 24,5 pg Insulin/min-Insel. Danach fielen die Sekretionswerte innerhalb von 10 Minuten wieder ab. Zwischen Minute 105 und Minute 120 betrug die Sekretionsrate gleichmäßig 6 bis 8 pg Insulin/min-Insel und lag damit konstant über den Werten in Gegenwart von 5 mM Glucose alleine und 5 mM Glucose zusammen mit 30  $\mu\text{M}$  Efaroxan. Die Wegnahme von 30  $\mu\text{M}$  Efaroxan bei Minute 120 ließ die Sekretionswerte nicht absinken.

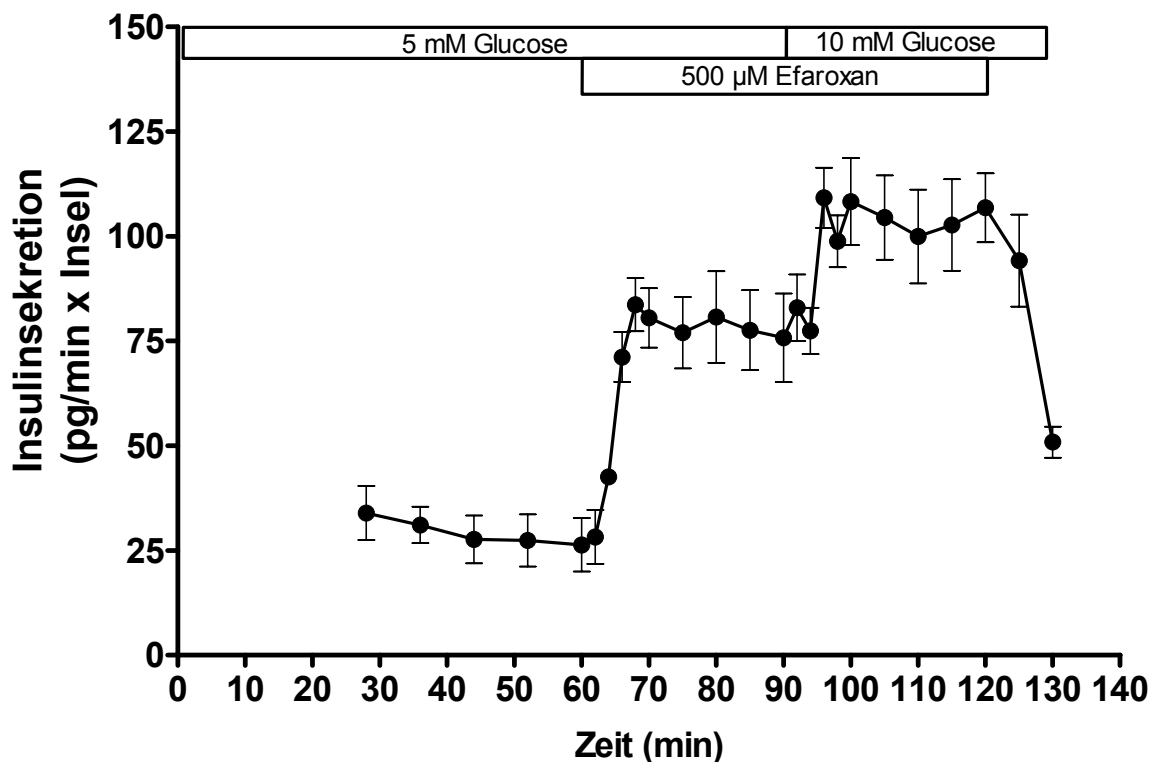


**Abbildung 4.2** Glucoseabhängiger Effekt von 30 µM Efaroxan auf die Insulinsekretion. Frisch isolierte Pankreas-Inseln der Maus wurden mit Krebs-Ringer-Medium, das bis zu Minute 90 5 mM Glucose und von Minute 90 bis Minute 130 10 mM Glucose enthielt, umströmt. Von Minute 60 bis Minute 120 waren 30 µM Efaroxan anwesend. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 Versuchen.



**Abbildung 4.3** Glucoseabhängiger Effekt von 100 µM Efaroxan auf die Insulinsekretion. Frisch isolierte Pankreas-Inseln der Maus wurden mit Krebs-Ringer-Medium, das bis zu Minute 70 5 mM Glucose und von Minute 70 bis Minute 110 10 mM Glucose enthielt, umströmt. Von Minute 40 bis Minute 100 waren 100 µM Efaroxan anwesend. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 Versuchen

Auch 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan bewirkten in Gegenwart von 5 mM Glucose keine Steigerung der Insulinsekretion (s. Abbildung 4.3). Vielmehr ergab der Vergleich der Integrale unter der Sekretionskurve (AUC), dass die AUC unter Kontrollbedingungen (Umströmung mit 5 mM Glucose alleine) zwischen Minute 10 bis Minute 40 243,6 pg Insulin betrug und durch die Zugabe von Efaroxan auf 131,0 pg Insulin zwischen Minute 40 und Minute 70, welches 53,8 % der Kontroll-AUC entsprach, reduziert wurde. Diese Reduktion war signifikant ( $P < 0,0001$ , t-Test). Eine Erhöhung der Glucose-Konzentration auf 10 mM führte in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan zu einem initial steilem Anstieg der Insulinsekretion. Dieser Anstieg fiel nach Erreichen eines Spitzenwertes von  $63,0 \pm 12,9$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 5$ ) innerhalb von 6 Minuten auf ein Zwischenminimum von  $43,0 \pm 6,5$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 5$ ) ab. Anschließend stieg die Sekretionsrate bis zum Ende der Umströmung wieder an. Hierbei erfolgte innerhalb von 20 Minuten eine Verdopplung der Sekretionsrate auf  $92,5 \pm 13,4$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 5$ ). Die AUC zwischen Minute 70 und Minute 100 betrug 1577,0 pg Insulin.

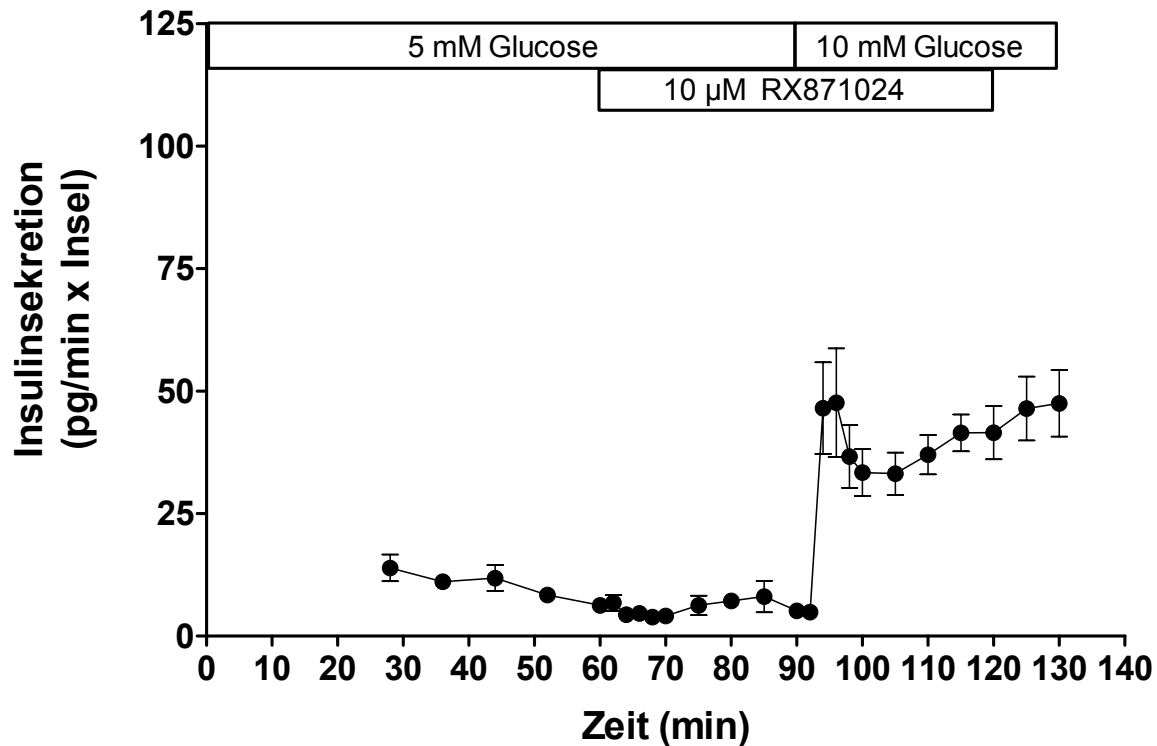


**Abbildung 4.4** Glucoseabhängiger Effekt von 500  $\mu\text{M}$  Efaroxan auf die Insulinsekretion. Frisch isolierte Pankreas-Inseln der Maus wurden mit Krebs-Ringer-Medium, das bis zu Minute 90 5 mM Glucose und von Minute 90 bis Minute 120 10 mM Glucose enthielt, umströmt. Von Minute 60 bis Minute 120 waren 500  $\mu\text{M}$  Efaroxan anwesend. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 Versuchen.

500  $\mu\text{M}$  Efaroxan bewirkten bei Zugabe zu einem Umströmungsmedium mit 5 mM Glucose innerhalb von 10 Minuten eine Steigerung der Sekretionsrate auf ein Plateau um 75 pg Insulin/min·Insel (s. Abbildung 4.4). Dieses Plateau wurde 30 Minuten lang gehalten, bis die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht wurde. Dann stieg die Sekretionsrate innerhalb von 6 Minuten auf ein Plateau um 105 pg Insulin/min·Insel. Dieses wurde solange aufrecht gehalten, bis die Testsubstanz ausgewaschen wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Wirkung von 500  $\mu\text{M}$  Efaroxan auf die Sekretion schnell reversibel war.

#### **4.1.2 Charakterisierung der insulinsekretionssteigernden Wirkung von RX871024 und Phentolamin**

Messungen der Insulinsekretion an frisch isolierten Inseln zeigten, dass 10  $\mu\text{M}$  RX871024 die Sekretion erst steigerten, wenn die Glucose-Konzentration von 5 mM auf 10 mM erhöht wurde (s. Abbildung 4.5). 6 Minuten nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  RX871024 zu dem Umströmungsmedium mit 5 mM Glucose betrug die Sekretionsrate  $4,6 \pm 0,8$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 4$ ). Die Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  RX871024 resultierte in einem schnell einsetzenden, steilen Anstieg der Sekretionsrate. 6 Minuten nach Erhöhung der Glucosekonzentration lag die Sekretionsrate bei  $47,6 \pm 11,1$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 4$ ). Nach diesem steilen Anstieg durchlief die Sekretionskurve von Minute 100 bis Minute 105 ein Zwischenminimum, in dem die Sekretionsrate 33,2 pg Insulin/min·Insel betrug. Anschließend stieg die Sekretionskurve stetig an und erreichte bei Minute 120 einen Wert von  $41,5 \pm 5,4$  pg Insulin/min·Insel. Die Wegnahme der Testsubstanz bei Minute 120 führte zu keinem Absinken der Sekretionsrate. Diese blieb bei Werte um 46 pg Insulin/min·Insel.

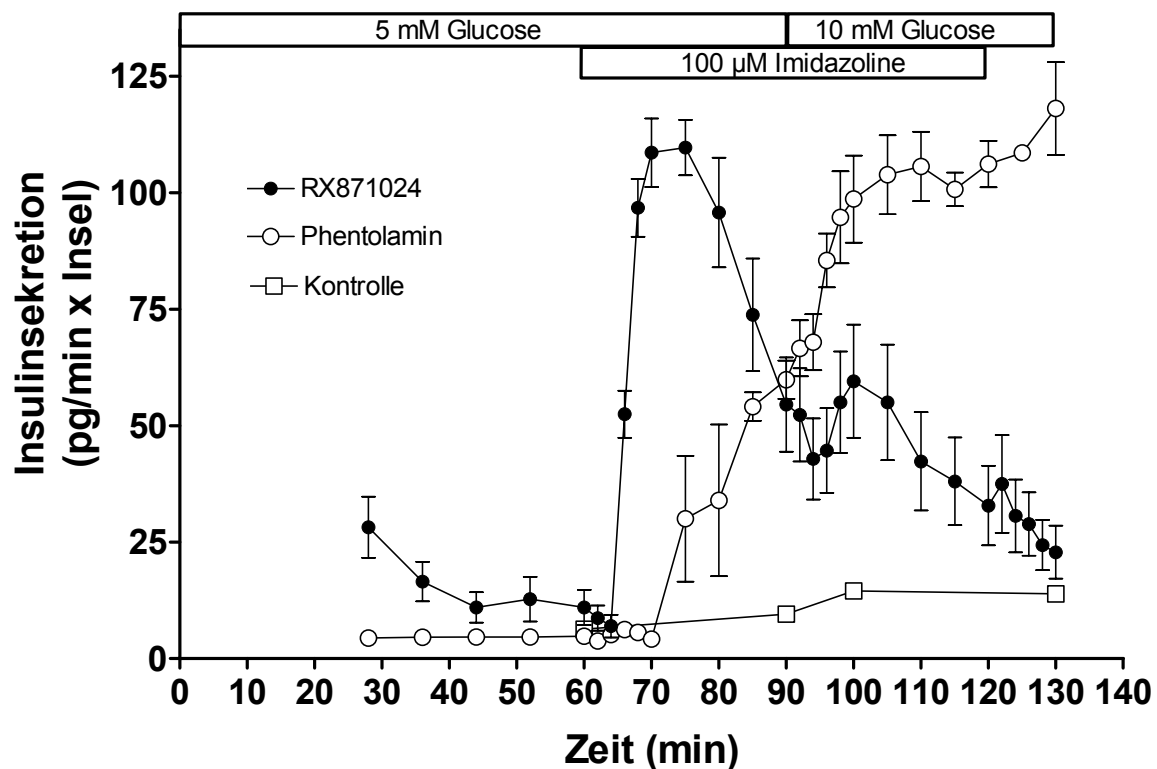


**Abbildung 4.5** Effekt auf die Insulinsekretion von 10  $\mu$ M RX871024. Frisch isolierte Pankreas-Inseln der Maus wurden mit Krebs-Ringer-Medium, das bis zu Minute 90 5 mM Glucose und von Minute 90 bis Minute 120 10 mM Glucose enthielt, umströmt. Von Minute 60 bis Minute 120 waren 10  $\mu$ M RX871024 anwesend. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 Versuchen.

100  $\mu$ M RX871024 bewirkten bereits in Gegenwart von 5 mM Glucose einen sehr steilen Anstieg der Sekretionsrate (s. Abbildung 4.6). Nach 6 Minuten war diese signifikant von  $11,0 \pm 3,8$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 6$ ) auf  $52,5 \pm 5,1$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 6$ ) erhöht und nach 10 Minuten war eine 10fache Steigerung auf  $108,6 \pm 7,3$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 6$ ) erreicht. Dieses Maximum wurde für 2 Minuten gehalten. Danach zeigte sich ein kontinuierlicher Rückgang der Sekretionsrate. Bei der Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 auf 10 mM nach 90 Minuten war die Sekretionsrate noch 5fach gegenüber Basalwerten erhöht. Die Erhöhung der Glucosekonzentration führte von Minute 94 bis Minute 100 zu einem Anstieg um ca. 30 %. Von Minute 100 bis zum Versuchsende (Minute 130) war wieder ein kontinuierlicher Abfall der Sekretionsrate zu beobachten. Bei Versuchsende betrug die Sekretionsrate noch gut das Doppelte der Basalsekretion.

Vorhergehende Untersuchungen zu Phentolamin (RUSTENBECK et al., 1999) zeigten, dass dieses Imidazolin eine Steigerung der Insulinsekretion bewirkte, die nicht glucoseselektiv war. Wir verglichen die Wirkung von 100  $\mu$ M Phentolamin mit 100  $\mu$ M RX871024 (s. Abbildung 4.6).

Auch Phentolamin steigerte die Sekretion schon in Gegenwart von 5 mM Glucose. Die Wirkung setzte jedoch erst nach 10 Minuten Umströmung ein und führte dann zu einem kontinuierlichem Anstieg der Sekretionsraten, die nach 30 Minuten bei  $59,9 \pm 4,1$  pg Insulin/min·Insel (n = 4) lag. Bei Erhöhung der Glucosekonzentration im Perifusionsmedium war bei der Sekretionsrate das Gleichgewicht noch nicht vollständig erreicht. Trotzdem war eindeutig erkennbar, dass der Anstieg der Glucosekonzentration zu einer weiteren und dauerhaften Erhöhung der Sekretionsrate führte. Diese erreichte 20 Minuten nach Erhöhung der Glucosekonzentration ein Plateau um 105 pg Insulin/min·Insel. Das Auswaschen von Phentolamin blieb ohne Effekt.



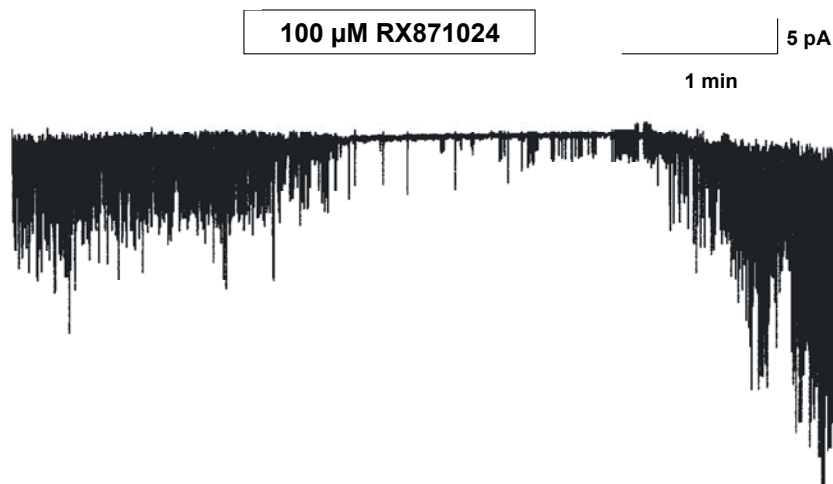
**Abbildung 4.6** Effekt von je 100  $\mu$ M Phentolamin und RX871024 auf die Insulinsekretion frisch isolierter Maus-Inseln. Die Inseln wurden 60 Minuten mit 5 mM Glucose perifundiert. Dann wurden entweder Phentolamin oder RX871024 zum Perifusionsmedium gegeben. Nach 30 Minuten wurde die Glucosekonzentration in Gegenwart der Testsubstanzen auf 10 mM erhöht. Nach weiteren 30 Minuten wurden die Testsubstanzen aus dem Perifusionsmedium entfernt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils 4 Versuchen. Die offenen Quadrate zeigen die Veränderung der Sekretion, wenn die Glucosekonzentration in Abwesenheit einer Testsubstanz von 5 mM auf 10 mM erhöht wird.



Es lässt sich zusammenfassen, dass beide Imidazoline die Sekretionsrate bereits in Gegenwart von 5 mM Glucose steigern. Auffallend ist die langsame Sekretionssteigerung durch Phentolamin, die sowohl auftritt, wenn die Substanz zugegeben wird, als auch, wenn die Glucosekonzentration erhöht wird.

#### 4.1.3 Vergleich der Wirkungen von Efaroxan, RX871024 und Phentolamin auf die $K_{ATP}$ -Kanalaktivität in intakten B-Zellen

Die Wirkung von Efaroxan, Phentolamin und RX871024 auf  $K_{ATP}$ -Kanäle wurde an intakten kultivierten B-Zellen der Maus mit der cell-attached Konfiguration der Patch-Clamp-Technik bestimmt (s. Tabelle 4.1).



**Abbildung 4.7** Originalregistrierung der  $K_{ATP}$ -Kanal-blockierenden Wirkung von 100  $\mu$ M RX871024 auf die Kanalaktivität in intakten kultivierten Maus B-Zellen. Repräsentative Abbildung für 8 Versuche.

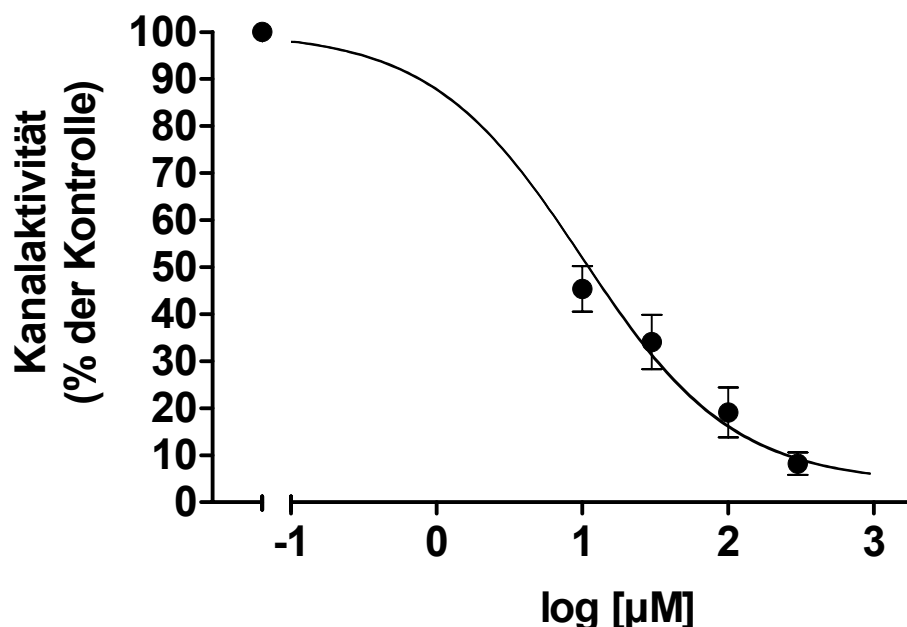
10  $\mu$ M RX871024 reduzierten die Kanalaktivität auf  $17,5 \pm 7,7$  % ( $n = 8$ ) und sind damit äquieffektiv zu 100  $\mu$ M Efaroxan, welches die Kanalaktivität auf  $19,1$  %  $\pm 5,3$  ( $n = 7$ ) reduzierte ( $P = 0,03$ , t-Test mit Welch Korrektur). Beim Einsatz von 10  $\mu$ M Phentolamin kam es zu einer Reduktion der Kanalaktivität auf  $41,0 \pm 6,1$  % ( $n = 5$ ), welches äquieffektiv mit der Reduktion der Kanalaktivität durch 30  $\mu$ M Efaroxan ( $34,0$  %  $\pm 5,8$  ( $n = 5$ )) war ( $P = 0,43$ , t-Test). Mit 300  $\mu$ M Efaroxan wurde eine Reduktion der Kanalaktivität auf  $8,2 \pm 2,4$  % ( $n =$

9) erreicht, die sich weder von der Reduktion durch 100  $\mu\text{M}$  RX871024 auf  $4,3 \pm 1,9 \%$  ( $n = 8$ ) (s. Abbildung 4.7) ( $P = 0,23$ ; t-Test) noch von der Reduktion durch 100  $\mu\text{M}$  Phentolamin auf  $3,7 \pm 1,7 \%$  ( $n = 6$ ) ( $P = 0,18$ ; t-Test) signifikant unterschied.

Die Berechnung einer Konzentrations-Wirkungskurve für Efaroxan in der cell-attached Konfiguration zeigte, dass mit Konzentrationen über 300  $\mu\text{M}$  nur eine geringfügig stärkere Reduktion der Kanalaktivität zu erwarten wäre. Es wurde für Efaroxan in der cell-attached Konfiguration eine  $\text{IC}_{50}$  von 9,9  $\mu\text{M}$  und ein Hill Koeffizient von -0,84 bestimmt (s. Abbildung 4.8).

| Untersuchte Konzentration | Efaroxan                      | RX871024                      | Phentolamin                   |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 10 $\mu\text{M}$          | $45,4 \pm 4,9 \%$ ( $n = 9$ ) | $17,5 \pm 7,7 \%$ ( $n = 8$ ) | $41,0 \pm 6,1 \%$ ( $n = 5$ ) |
| 30 $\mu\text{M}$          | $34,0 \pm 5,8 \%$ ( $n = 5$ ) | -                             | -                             |
| 100 $\mu\text{M}$         | $19,1 \pm 5,3 \%$ ( $n = 7$ ) | $4,3 \pm 1,9 \%$ ( $n = 8$ )  | $3,7 \pm 1,7 \%$ ( $n = 6$ )  |
| 300 $\mu\text{M}$         | $8,2 \pm 2,4 \%$ ( $n = 9$ )  | -                             | -                             |

**Tabelle 4.1** Effekte von Efaroxan, RX871024 und Phentolamin auf die  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität in intakten kultivierten Maus-B-Zellen. Angegeben ist die prozentuale Restaktivität bezogen auf einen Kontrollwert von 100 % Kanalaktivität, den die B-Zellen in extrazellulärer Lösung ohne Glucose aufwiesen. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM der in Klammern angegebenen Versuchsanzahl. Die Werte für 10  $\mu\text{M}$  Efaroxan entstammen der Versuchsreihe, die in 4.3.1 dargestellt ist und diejenigen für 100  $\mu\text{M}$  der Versuchsreihe, die in 4.2.2 dargestellt ist.



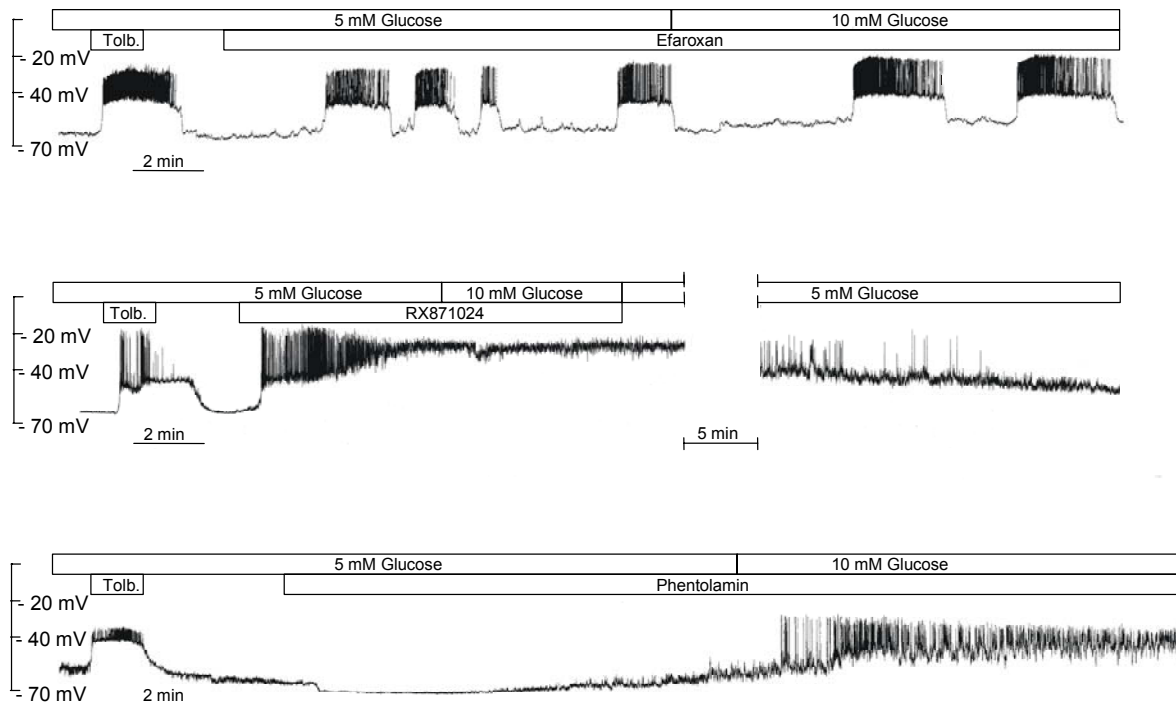
**Abbildung 4.8** Konzentrationsabhängige Hemmung der  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität durch Efaroxan gemessen in der cell-attached-Konfiguration. Die dargestellten Werte (s. Tabelle 4.1) sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5-9 Versuchen. Die  $\text{IC}_{50}$  für Efaroxan beträgt 9,9  $\mu\text{M}$  und der Hill-Koeffizient beträgt -0,84.

#### **4.1.4 Vergleich der Wirkungen von Efaroxan, RX871024 und Phentolamin auf das Membranpotential von B-Zellen**

In metabolisch intakten B-Zellen wurde der depolarisierende Effekt von Efaroxan, RX871024 und Phentolamin unter Anwendung der perforated-patch Konfiguration gemessen. In der perforated-patch Konfiguration waren unter unseren Bedingungen zum Teil Aktionspotentiale zu beobachten. Deswegen wurde jeweils ein Wert für das Plateau der Depolarisation und ein Wert für die Spitze des Aktionspotentials angegeben. Der Plateau-Wert gibt die Schwelle an, von der die Aktionspotentiale starten und der Spitzenwert gibt das maximale Ausmaß des Aktionspotentials an.

In Gegenwart von 5 mM Glucose depolarisierten 100  $\mu$ M Efaroxan ausgehend von einem Ruhemembranpotential von  $-68,0 \pm 1,2$  mV die Plasmamembran innerhalb von durchschnittlich 3 Minuten auf einen Plateauwert von  $-55,3 \pm 6,6$  mV ( $n = 5$ ) (s. Tabelle 4.2). Phentolamin hingegen benötigte 8 Minuten, um das Plasmamembranpotential von einem Ruhewert von  $-60,1 \pm 1,4$  mV auf einen Plateauwert von  $-51,0 \pm 2,2$  mV ( $n = 5$ ) zu depolarisieren. Die Wirkung von 100  $\mu$ M RX871024 auf das Membranpotential, welches von  $-64,6 \pm 1,3$  mV auf  $-34,8 \pm 4,7$  mV ( $n = 5$ ) reduziert wurde, trat ähnlich schnell wie die Wirkung des Efaroxans ein. Damit war die durch 100  $\mu$ M RX871024 in Gegenwart von 5 mM Glucose bewirkte Depolarisation auf Plateau-Werte signifikant stärker als die durch 100  $\mu$ M Efaroxan ( $P = 0,04$ , T-test) und 100  $\mu$ M Phentolamin ( $P = 0,01$ , T-test) bewirkte Depolarisation.

In der perforated-patch Konfiguration sollte weiterhin der Einfluss eines gesteigerten Energiestoffwechsels auf das Membranpotential der B-Zellen in Gegenwart der Imidazoline untersucht werden. In diesen Versuchen, die eine Länge von mindestens 20 Minuten aufwiesen, wurde die Glucosekonzentration in Gegenwart der Testsubstanz von 5 mM auf 10 mM erhöht (s. Abbildung 4.9). Dabei zeigte sich, dass die Erhöhung der Glucosekonzentration in Gegenwart aller drei Testsubstanzen keine signifikante Veränderung des Ausmaßes der Depolarisation bewirkte (s. Tabelle 4.2). Bei den Langzeitversuchen, die alle qualitativ und jeweils 5 quantitativ ausgewertet wurden, waren in Gegenwart von Efaroxan in 5 von 10 Versuchen Oszillationen beobachtet. In Gegenwart von RX871024 wurden bei 2 von 5 Versuchen Oszillationen beobachtet und in Gegenwart von Phentolamin traten in 5 von 5 Versuchen keine Oszillationen auf.



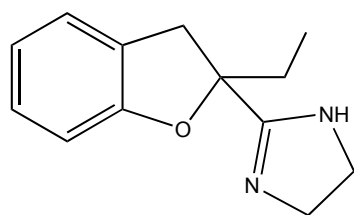
**Abbildung 4.9** Vergleich der depolarisierenden Wirkung von Efaroxan, RX871024 und Phentolamin (jeweils 100  $\mu$ M) in der perforated-patch Konfiguration. Als Funktionskontrolle der B-Zellen wurde die Reaktion auf 500  $\mu$ M Tolbutamid (Tolb.) vor Applikation der Imidazoline getestet. Nur Zellen, die sofort auf Tolbutamid reagierten, wurden für die Versuche verwendet. Die Werte sind Abbildungen von jeweils 10, 5 und 5 Versuchen.

| Untersuchte Bedingung                | 100 $\mu$ M Efaroxan       | 100 $\mu$ M RX871024       | 100 $\mu$ M Phentolamine   |
|--------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| EZ vorher (5 mM Glucose)             | -68,0 $\pm$ 1,2 mV (n = 5) | -64,6 $\pm$ 1,3 mV (n = 5) | -60,1 $\pm$ 1,4 mV (n = 5) |
| Imidazolin (5 mM Glucose) (Plateau)  | -55,3 $\pm$ 6,6 mV (n = 5) | -34,8 $\pm$ 4,7 mV (n = 5) | -51,0 $\pm$ 2,2 mV (n = 5) |
| Imidazolin (5 mM Glucose) (Spitze)   | -40,2 $\pm$ 8,7 mV (n = 3) | -20,4 $\pm$ 7,0 mV (n = 3) | -27,9 $\pm$ 7,1 mV (n = 4) |
| Imidazolin (10 mM Glucose) (Plateau) | -48,2 $\pm$ 8,9 mV (n = 5) | -33,6 $\pm$ 5,9 mV (n = 5) | -47,5 $\pm$ 2,7 mV (n = 5) |
| Imidazolin (10 mM Glucose) (Spitze)  | -28,6 $\pm$ 7,3 mV (n = 3) | -24,1 $\pm$ 7,9 mV (n = 2) | -25,3 $\pm$ 6,5 mV (n = 5) |
| EZ nachher (5 mM Glucose) (Plateau)  | -65,3 $\pm$ 1,8 mV (n = 3) | -57,8 $\pm$ 1,3 mV (n = 5) | -46,6 $\pm$ 4,0 mV (n = 3) |
| EZ nachher (5 mM Glucose) (Spitze)   | -                          | -                          | -23,8 $\pm$ 3,6 mV (n = 3) |

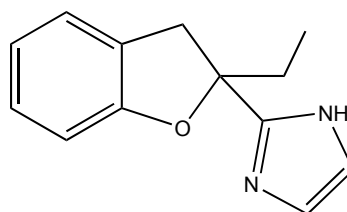
**Tabelle 4.2** Effekte von Efaroxan, RX871024 und Phentolamin auf das Membranpotential in intakten B-Zellen gemessen in der perforated-patch-Konfiguration. Die extrazelluläre Lösung enthielt zunächst 5 mM und dann 10 mM Glucose. In dieser Konfiguration waren bei Depolarisation unter den vorliegenden Bedingungen Aktionspotentiale zu beobachten. Deswegen wurde jeweils ein Wert für das Plateau des Aktionspotentials und ein Wert für die Spitze des Aktionspotentials angegeben. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM der jeweils in Klammern angegebenen Versuchszahl. Die unterschiedliche Versuchsanzahl bei Plateau- und Spitzen-Werten ergibt sich daraus, dass nicht an jeder Zelle Aktionspotentiale beobachtet wurden. Die Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 auf 10 mM beeinflusste in keinem Fall das Ausmaß der Depolarisation ( $P > 0,2$ , t-Test).

## 4.2 Vergleich der Wirkungen von Efaroxan und seinem Imidazol-Analogen KU14R, einem vermeintlichen Imidazolin-Antagonisten

Die Substanz KU14R unterscheidet sich von dem insulinsekretionssteigernden Imidazolin Efaroxan dadurch, dass der Imidazolinring gegen einen Imidazolring ausgetauscht wurde (s. Abbildung 4.10). Der strukturelle Unterschied besteht also lediglich in einer zusätzlichen Doppelbindung bei KU14R gegenüber Efaroxan. Für KU14R wurde beschrieben, dass die Substanz eine spezifische antagonistische Wirkung auf die durch Imidazoline gesteigerte Insulinsekretion ausübt. Daher wurde KU14R als Antagonist an Imidazolin-Rezeptoren der B-Zelle bezeichnet. Jedoch wurde auch von einer eigenen insulinsekretionssteigernden Wirkung durch KU14R berichtet. Daher schien die Überprüfung der Mechanismen, mit denen KU14R die Insulinsekretion beeinflusst, notwendig. Zunächst sollten die Wirkungen beider Substanzen einzeln und in Kombination auf die Insulinsekretion bestimmt und anschließend die elektrophysiologischen Effekte beider Substanzen analysiert werden. Unter anderem sollte geklärt werden, ob sich eine antagonistische Wirkung von KU14R und Efaroxan am  $K_{ATP}$ -Kanal nachweisen ließ.



Efaroxan



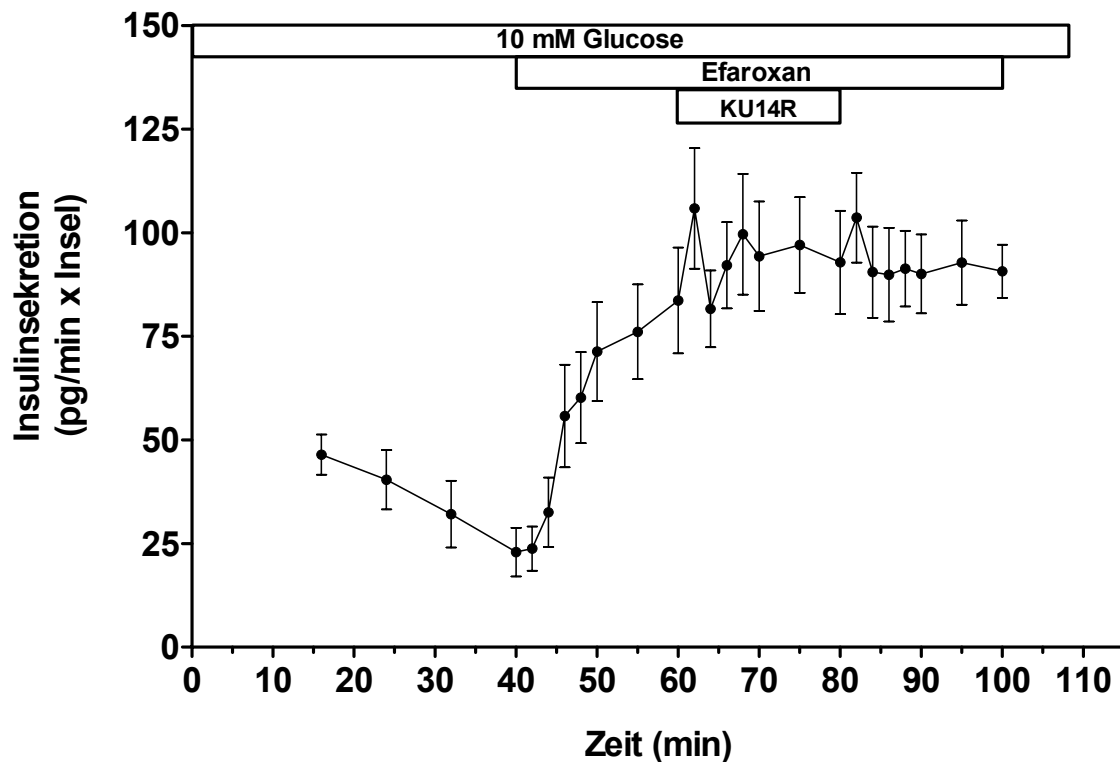
KU14R

**Abbildung 4.10** Strukturformeln des Imidazolins Efaroxan und seinem Imidazol-Analogen KU14R

### 4.2.1 Wirkungen von Efaroxan und KU14R auf die Insulinsekretion

Die Substanzen wurden für die Insulinsekretionsmessungen in einer Konzentration von 100  $\mu$ M eingesetzt, da mit dieser Konzentration der Antagonismus zwischen Efaroxan und KU14R ursprünglich beschrieben wurde. Wurden 100  $\mu$ M Efaroxan zu dem Perifusionsmedium mit 10 mM Glucose gegeben, erfolgte eine schnell einsetzende Steigerung der Insulinsekretion frisch isolierter Inseln. Es kam zu einer Verdopplung der Sekretionsrate von  $22,9 \pm 5,9$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 3$ ) auf  $55,8 \pm 12,4$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 3$ ) innerhalb von 6 Minuten. Nach 20 Minuten war ein Plateau erreicht. Dieses Plateau lag ungefähr auf 400 % des letzten prästimulatorischen Wertes. Die Sekretionsrate wurde durch die zusätzliche Anwesenheit von KU14R für 20 Minuten nicht vermindert. Auch ein additiver

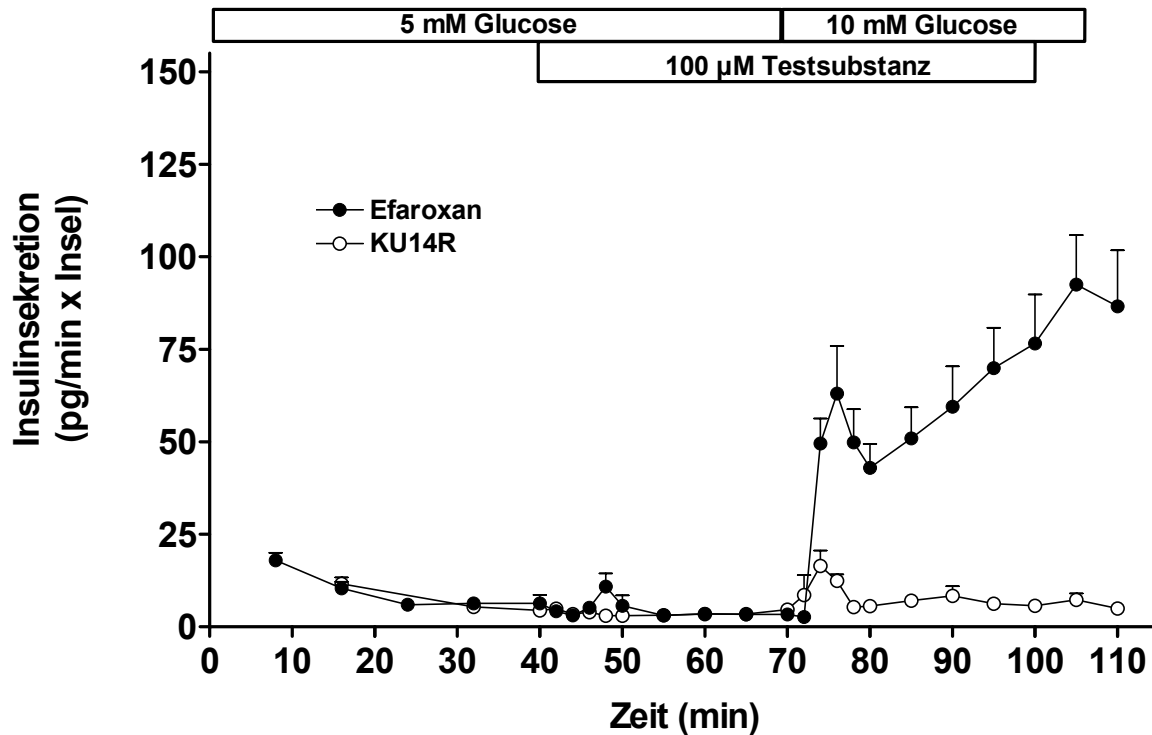
Effekt war nicht festzustellen. Dieses zeigte sich durch Vergleich der Sekretionsraten nach Auswaschen von KU14R (s. Abbildung 4.11).



**Abbildung 4.11** Wirkung von Efaroxan (100  $\mu$ M) und der Kombination aus Efaroxan und KU14R (jeweils 100  $\mu$ M) auf die Insulinsekretion. Frisch isolierte Pankreas-Inseln der Maus wurden mit Krebs-Ringer-Medium (10 mM Glucose) umströmt. Von Minute 40 bis Minute 100 waren 100  $\mu$ M Efaroxan und von Minute 60 bis 80 zusätzlich 100  $\mu$ M KU14R anwesend. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 Versuchen.

Wurde zu einem Medium mit 5 mM Glucose, in dem die Sekretionsrate  $5,4 \pm 0,7$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 6$ ) betrug, 100  $\mu$ M KU14R gegeben, so führte das beim Vergleich der AUCs zwischen Minute 10 und 40 in alleiniger Gegenwart von 5 mM Glucose (Kontrolle) und Minute 40 und Minute 70 in Gegenwart von 5 mM Glucose und 100  $\mu$ M KU14R zu einer mäßigen aber signifikanten Absenkung der Sekretionsrate auf 38,7 % der Kontrolle ( $P < 0,0001$ ). Die Sekretionsrate betrug bei Anwesenheit von 100  $\mu$ M KU14R  $3,0 \pm 0,3$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 6$ ). Der Wechsel der Glucose-Konzentration von 5 auf 10 mM in Gegenwart von 100  $\mu$ M KU14R führte zu einem kurzem Anstieg auf leicht erhöhte Sekretionswerte bis zu einem Spitzenwert von  $16,5 \pm 4,2$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 6$ ) nach 4 Minuten. Die Sekretion sank aber innerhalb von 10 Minuten wieder auf Werte von  $4,9 \pm 1,1$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 6$ ) bis  $8,4 \pm 2,6$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 6$ ) ab. Der Vergleich der Integrale unter den Sekretionskurven zeigte, dass die Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 10 mM in Gegenwart von 100  $\mu$ M Efaroxan eine Steigerung der Sekretion auf

1304 % der Sekretionsrate in Gegenwart von 5 mM Glucose und 100  $\mu$ M Efaroxan bewirkte (zur genaueren Beschreibung des Sekretionsverhalten unter Stimulation mit 100  $\mu$ M Efaroxan s. 4.1.1). In Gegenwart von 100  $\mu$ M KU14R erfolgte dagegen durch Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM nur eine Steigerung auf 224 % der Sekretionsrate in Gegenwart von 5 mM Glucose und 100  $\mu$ M KU14R.



**Abbildung 4.12** Wirkungen von Efaroxan und KU14R (jeweils 100  $\mu$ M) auf die Insulinsekretion. Frisch isolierte Pankreas-Inseln der Maus wurden mit Krebs-Ringer-Medium, das bis zu Minute 70 5 mM Glucose und von Minute 70 bis Minute 110 10 mM Glucose enthielt, umströmt. Von Minute 40 bis Minute 100 waren 100  $\mu$ M Efaroxan oder 100  $\mu$ M KU14R anwesend. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 Versuchen. (Kontrollversuch mit alleiniger Umströmung mit zunächst 5 mM Glucose und dann 10 mM Glucose s. Abbildung 4.6)



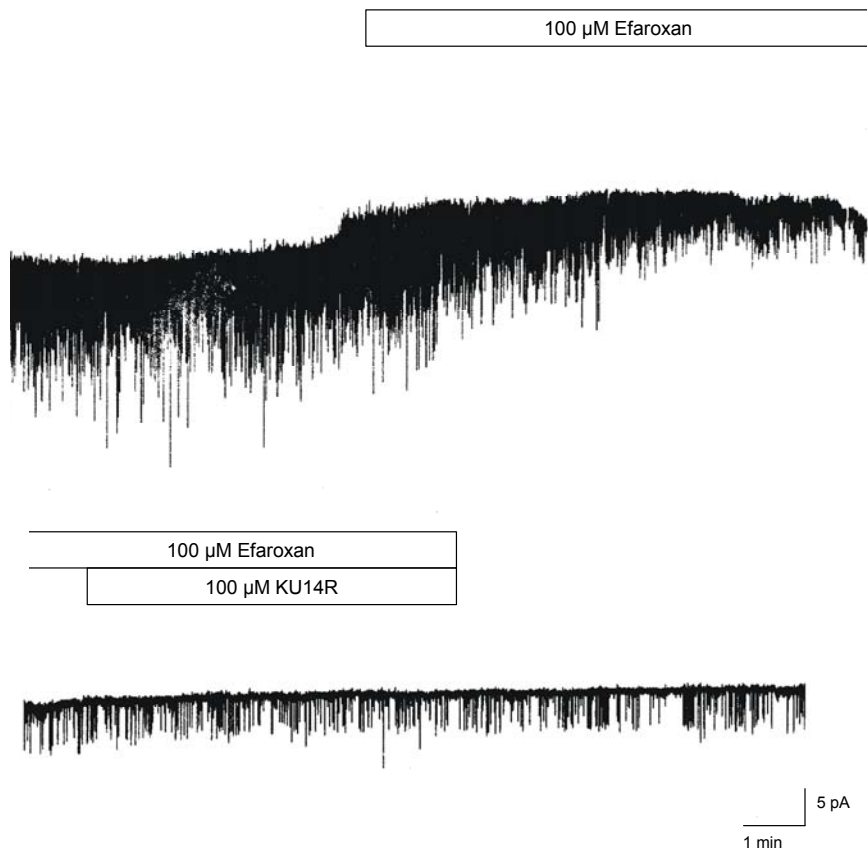
#### 4.2.2 Wirkungen von Efaroxan und KU14R auf $K_{ATP}$ -Kanäle in intakten B-Zellen

Der ursprünglich beschriebene Antagonismus zwischen KU14R und Efaroxan im Bereich der Insulinsekretion wurde damit erklärt, dass KU14R in der Lage war, durch Efaroxan geschlossene  $K_{ATP}$ -Kanäle wieder zu öffnen. Da bei den vorliegenden Sekretionsmessungen kein Antagonismus zu finden war, wurde die Wirkung beider Substanzen und ihrer Kombination auf die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität bestimmt. Hierzu wurde in der cell-attached – Konfiguration gemessen, um dem Verhalten der intakten B-Zelle während der Sekretionsversuche möglichst nahe zu kommen. Beide Substanzen schlossen  $K_{ATP}$ -Kanäle, wenn sie mit der Badlösung appliziert wurden. 100  $\mu$ M Efaroxan reduzierten die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität auf  $19,1 \% \pm 5,3$  ( $n = 7$ ), 100  $\mu$ M KU14R reduzierten sie auf  $49,6 \% \pm 11,5$  ( $n = 8$ ) der Kontrolle (s. Tabelle 4.3). Die Wirkung von 100  $\mu$ M KU14R war damit signifikant schwächer ( $P = 0,04$ , t-Test mit Welch Korrektur).

Wurden  $K_{ATP}$ -Kanäle durch 100  $\mu$ M Efaroxan geschlossen, bewirkte die zusätzliche Applikation von 100  $\mu$ M KU14R eine  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität von  $11,8 \% \pm 6,1$  ( $n = 6$ ) (s. Abbildung 4.13). Die Reduktion der Kanalaktivität durch eine Kombination beider Substanzen unterschied sich nicht signifikant von der durch Efaroxan alleine bewirkten Kanalblockade ( $P = 0,38$ , t-Test). Ein Antagonismus zwischen Efaroxan und KU14R hinsichtlich einer Reduktion der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität ließ sich daher nicht nachweisen.

#### 4.2.3 Wirkungen von Efaroxan und KU14R auf das Membranpotential von B-Zellen

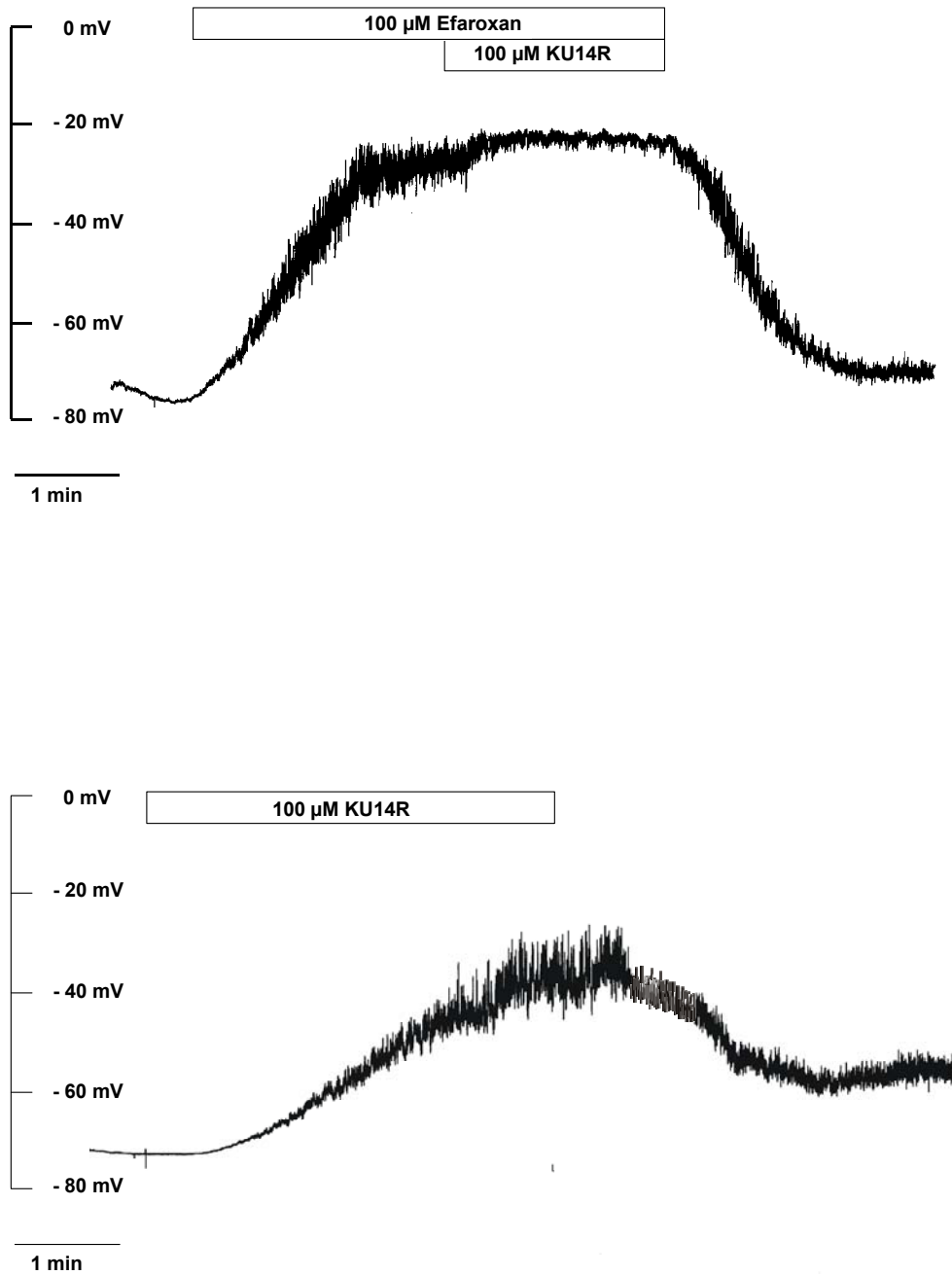
Messungen des Membranpotentials in der konventionellen whole-cell-Konfiguration zeigten eine signifikante Depolarisation durch jeweils 100  $\mu$ M Efaroxan und KU14R. Innerhalb von 30 Sekunden nach Umschalten der Badperfusion wurde die depolarisierende Wirkung von 100  $\mu$ M Efaroxan erkennbar. Innerhalb von 3 Minuten war ausgehend von einem Ruhepotential von  $-73,3 \pm 1,7$  mV ( $n = 7$ ) ein Plateau von  $-28,6 \pm 3,4$  mV ( $n = 7$ ) erreicht. Die Applikation von 100  $\mu$ M KU14R auf durch 100  $\mu$ M Efaroxan depolarisierte B-Zellen bewirkte ein Membranpotential von  $-24,9 \pm 3,8$  mV ( $n = 7$ ). Es kam also zu einer nicht signifikanten Zunahme des durch Efaroxan allein hervorgerufenen depolarisierenden Effekts ( $P = 0,48$ ; t-Test) (s. Tabelle 4.4, Abbildung 4.14 und Abbildung 4.15). Der Effekt von 100  $\mu$ M KU14R war 2 Minuten nach Umschalten der Badperfusion erkennbar. KU14R wies eine langsamere Kinetik als Efaroxan auf. Eine maximal depolarisierende Wirkung von einem Ruhemembranpotential von  $-73,6 \pm 1,8$  mV ( $n = 9$ ) ausgehend auf  $-33,0 \pm 4,0$  mV ( $n = 9$ ) war nach 4 Minuten erreicht. Dieser Effekt war nicht signifikant verschieden von dem Effekt von Efaroxan ( $P = 0,42$ , t-Test mit Welch-Korrektur) und dem Effekt der Kombination aus Efaroxan und KU14R ( $P = 0,18$ , t-Test).



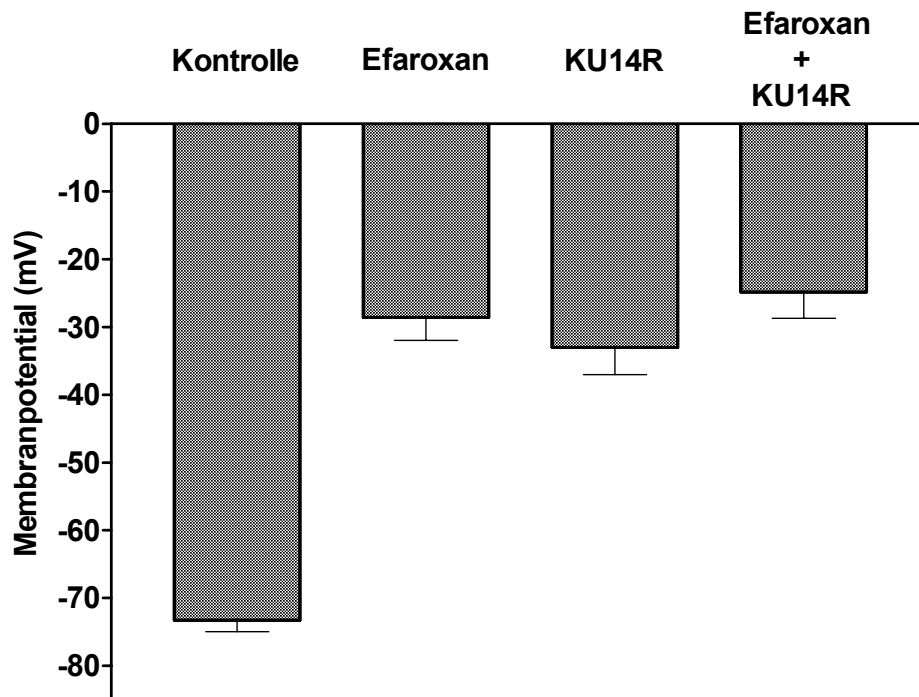
**Abbildung 4.13** Originalregistrierung der Wirkung von Efaroxan und der Kombination aus Efaroxan und KU14R auf das Öffnungsverhalten von  $K_{ATP}$ -Kanälen in intakten Maus B-Zellen. Zugabe von 100  $\mu$ M Efaroxan zur Bad-Lösung reduzierte die Offenwahrscheinlichkeit von  $K_{ATP}$ -Kanälen. Ein Gleichgewicht der Wirkung war nach 5 Minuten erreicht. Die Auswertung des Efaroxan Effekts erfolgte direkt vor der Zugabe von KU14R. Die zusätzliche Anwesenheit von 100  $\mu$ M KU14R für 6 Minuten bewirkte keine Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit von  $K_{ATP}$ -Kanälen. Repräsentative Abbildung für 6 Versuche.

|                          | Efaroxan<br>(100 $\mu$ M)   | KU14R<br>(100 $\mu$ M)      | Efaroxan und KU14R<br>(jeweils 100 $\mu$ M) |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|
| Relative Kanal-Aktivität | 19,1 % $\pm$ 5,3<br>(n = 7) | 49,6% $\pm$ 11,5<br>(n = 8) | 11,8 % $\pm$ 6,1<br>(n= 6)                  |

**Tabelle 4.3** Wirkung von Efaroxan, KU14R und der Kombination aus Efaroxan und KU14R auf  $K_{ATP}$ -Kanäle in intakten kultivierten B-Zellen. Die Einzelkanalaktivität wurde bezogen auf die Aktivität vor Zugabe der Testsubstanz. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM der jeweils in Klammern angegebenen Versuchszahl.



**Abbildung 4.14** Originalregistrierung des Effekts von Efaroxan, KU14R und der Kombination aus Efaroxan und KU14R auf das Membranpotential einzelner B-Zellen in der whole-cell-Konfiguration.



**Abbildung 4.15** Übersicht über die Wirkungen von jeweils 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan und KU14R und der Kombination aus je 100  $\mu\text{M}$  beider Substanzen auf das Membranpotential. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 7 bis 9 Versuchen.

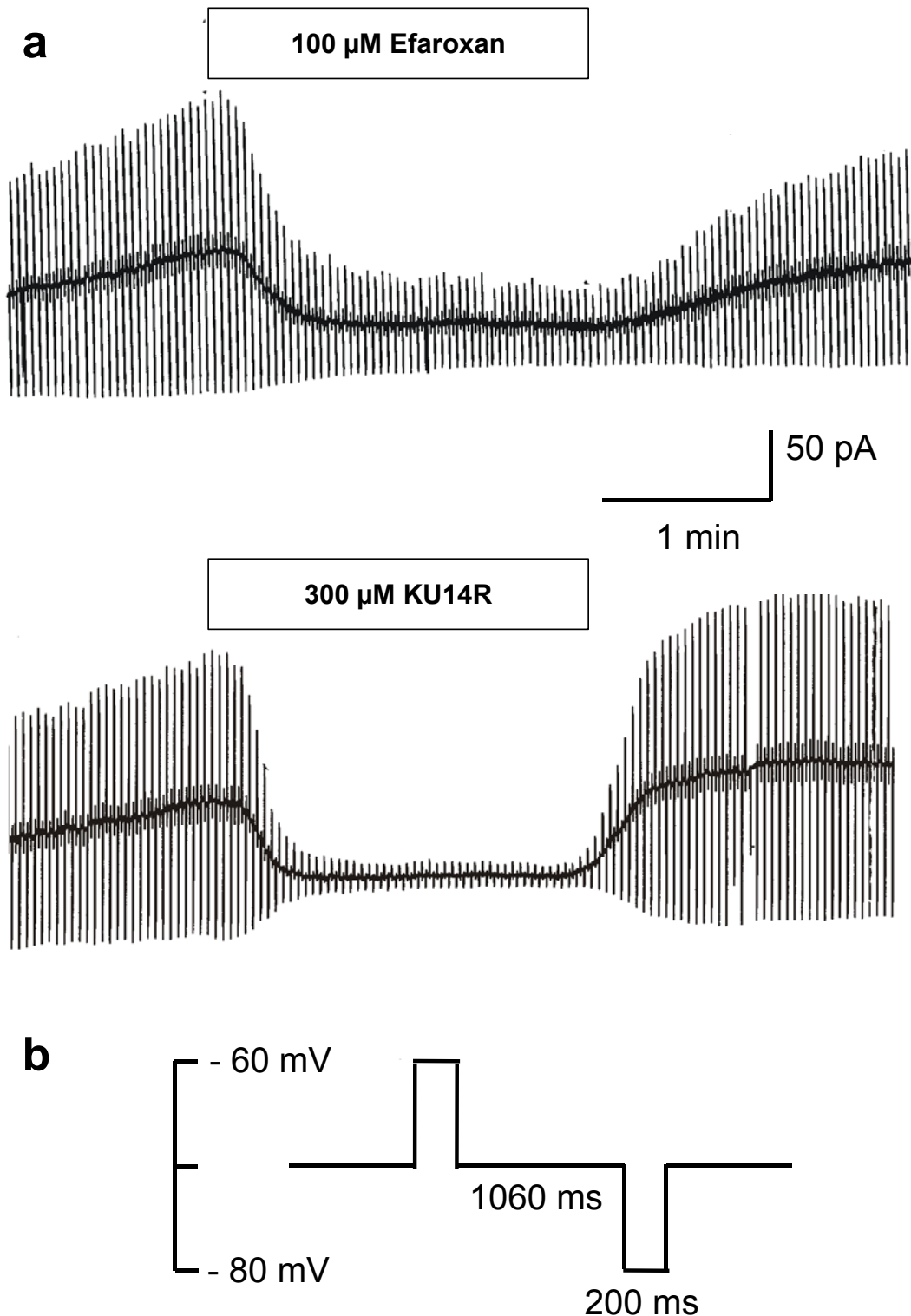
Wird das Ausmaß der Depolarisation, also die Differenz zwischen Ruhemembranpotential und maximaler Depolarisation unter Einfluss der Testsubstanz, betrachtet, so sind die Effekte von Efaroxan, KU14R und der Kombination aus Efaroxan und KU14R nicht signifikant verschieden. Beim Vergleich der Depolarisation durch 100  $\mu\text{M}$  KU14R und der äquimolaren Kombination beider Testsubstanzen ( $P = 0,09$ ; t-Test), aber ein Antagonismus ist auf keinen Fall zu beobachten.

| Ausmaß der Depolarisation  | Efaroxan (100 $\mu\text{M}$ ) | KU14R (100 $\mu\text{M}$ ) | Efaroxan und KU14R (jeweils 100 $\mu\text{M}$ ) |
|--|-------------------------------|----------------------------|---|
| Differenz zwischen Ruhemembranpotential und der durch die Imidazoline bewirkten Depolarisation | 44,7 $\pm$ 2,2 mV (n = 7)     | 40,6 $\pm$ 3,0 mV (n = 9)  | 48,4 $\pm$ 3,1 mV (n = 7)                       |

**Tabelle 4.4** Effekte von 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan, 100  $\mu\text{M}$  KU14R und ihrer Kombination (jeweils 100  $\mu\text{M}$ ) auf das Membranpotential isolierter B-Zellen in der konventionellen whole-cell-Konfiguration. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM der jeweils in Klammern angegebenen Versuchszahl.

#### **4.2.4 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Efaroxan und KU14R auf $K_{ATP}$ -Kanäle in der whole-cell-Konfiguration**

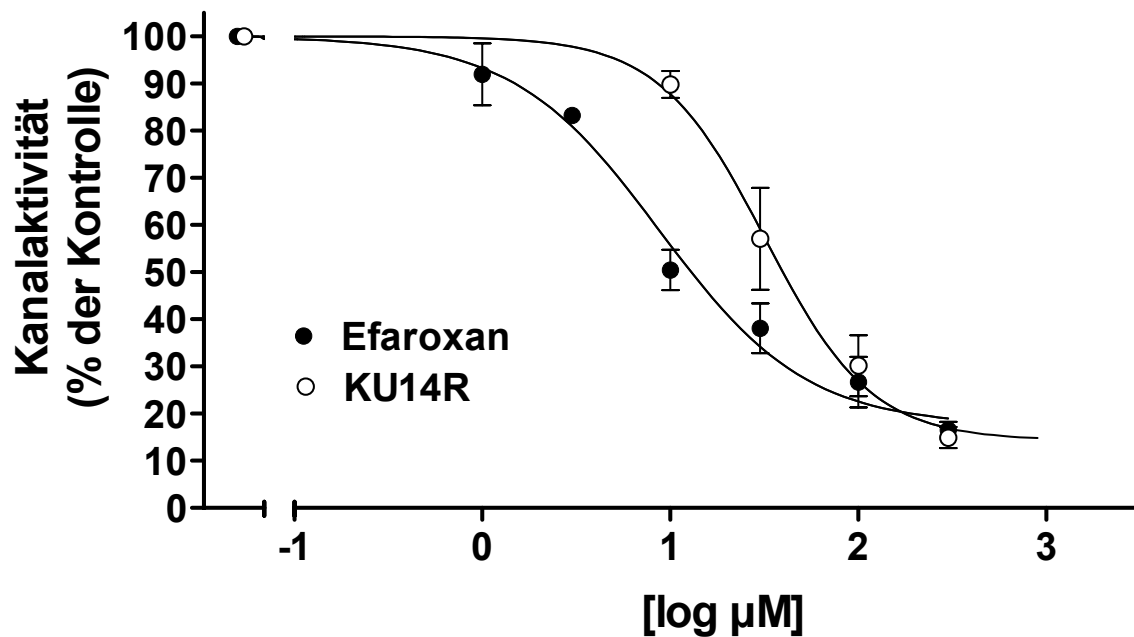
KU14R zeigte in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  praktisch einen gleich starken depolarisierenden Effekt wie 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan (s. 4.2.3), obwohl es in dieser Konzentration eine signifikant schwächere Reduktion der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität bewirkte (s. 4.2.2). Als Ursache dieser Diskrepanz wurde die unterschiedliche Messkonfiguration (intakte Zelle bei Messungen der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität gegenüber der offenen, dialysierten Zelle bei der Messung des Membranpotentials) vermutet. Daher wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve beider Substanzen in der whole-cell Konfiguration unter Voltage-Clamp Bedingungen aufgenommen (s. Abbildung 4.16, Abbildung 4.17 und Tabelle 4.5). Zur Bestimmung der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität wurde das Stimulationsprotokoll nach Trube (TRUBE et al., 1986) verwendet. In diesem wurden von einem Haltepotential von  $-70\text{ mV}$  ausgehend abwechselnd Hyper- und Depolarisationen von jeweils 10 mV vorgenommen (s. Abbildung 4.16b). Die resultierende Stromdifferenz zwischen  $-60\text{ mV}$  und  $-80\text{ mV}$  in Gegenwart der Testsubstanzen wurde auf die Differenz des Stromflusses zwischen  $-60\text{ mV}$  und  $-80\text{ mV}$  in Abwesenheit der Testsubstanz bezogen. Durch Efaroxan und KU14R wurde in beiden Fällen ein kompletter Schluss von  $K_{ATP}$ -Kanälen erreicht. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte betrugen für Efaroxan 8,8  $\mu\text{M}$  (Hill-Koeffizient:  $-1,1$ ) und für KU14R 31,9  $\mu\text{M}$  (Hill-Koeffizient:  $-1,5$ ). Die verbleibende Restaktivität von 16,6 % bei 300  $\mu\text{M}$  Efaroxan und 14,9 % bei 300  $\mu\text{M}$  KU14R ähnelt der Restaktivität in Gegenwart von 500  $\mu\text{M}$  Tolbutamid, die  $18,0 \pm 2,2\%$  ( $n = 3$ ) betrug. Da eine solche Tolbutamid-Konzentration in dieser Messkonfiguration praktisch maximal wirksam ist, wurden für diesen Reststrom andere Mechanismen als der Stromfluss durch  $K_{ATP}$ -Kanäle verantwortlich gemacht.



**Abbildung 4.16** Originalregistrierung der  $K_{ATP}$ -Kanal blockierenden Wirkung von Efaroxan und KU14R in der konventionellen whole-cell-Konfiguration unter Voltage-Clamp-Bedingungen. Die in a gezeigten Stromregistrierungen sind das Ergebnis des in b angegebenen Voltage-Clamp-Stimulationsprotokolls. Als maßgeblicher Stromfluss wurde die Differenz des Stromflusses bei - 60 mV und - 80 mV definiert.

| Untersuchte Konzentration | Reststrom in Gegenwart von |                            |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                           | Efaroxan                   | KU14R                      |
| 0 $\mu\text{M}$           | 100 %                      | 100 %                      |
| 1 $\mu\text{M}$           | 91,9 % $\pm$ 6,6 (n = 3)   | -                          |
| 3 $\mu\text{M}$           | 83,3 % $\pm$ 0,9 (n = 3)   | -                          |
| 10 $\mu\text{M}$          | 50,4 % $\pm$ 4,3 (n = 4)   | 89,8 % $\pm$ 2,9 (n = 3) - |
| 30 $\mu\text{M}$          | 38,1 % $\pm$ 5,3 (n = 5)   | 57,1 % $\pm$ 10,8 (n = 3)  |
| 100 $\mu\text{M}$         | 26,7 $\pm$ 5,3 (n = 6)     | 30,2 % $\pm$ 6,5 (n = 4)   |
| 300 $\mu\text{M}$         | 16,6 $\pm$ 1,7 (n = 3)     | 14,9 % $\pm$ 2,2 (n = 4)   |

**Tabelle 4.5** Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Efaroxan und KU14R auf die  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität gemessen in der whole-cell-Konfiguration. Die Stromdifferenz zwischen  $-60\text{ mV}$  und  $-80\text{ mV}$  in Abwesenheit der Testsubstanzen wurde als 100 % definiert. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM der jeweils in Klammern angegebenen Versuchszahl.

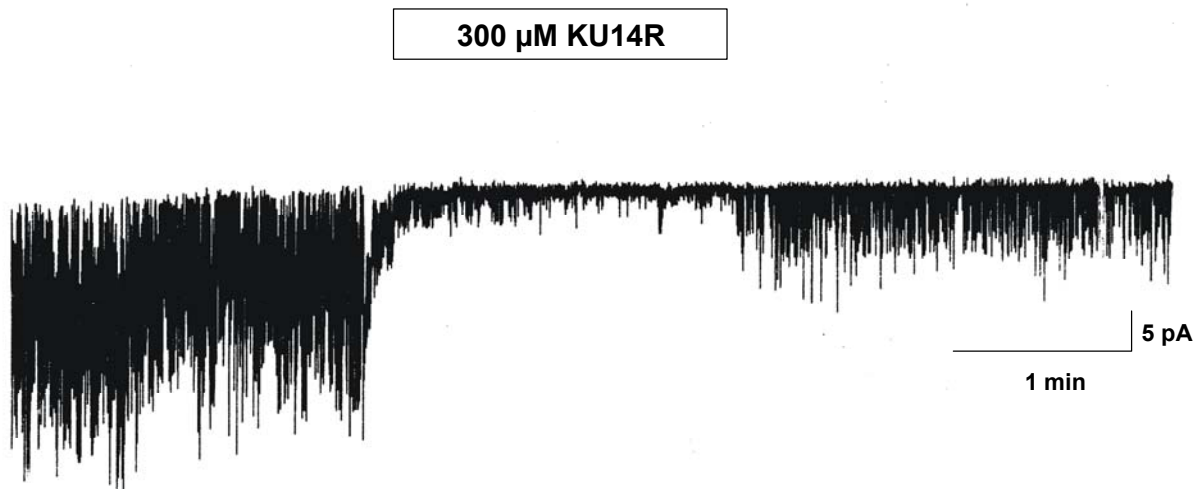


**Abbildung 4.17** Konzentrations-Wirkungskurven von Efaroxan und KU14R. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3-6 Versuchen wie in Tabelle 4.5 aufgeführt. Aus der Kurvenanpassung ergab sich für Efaroxan eine  $\text{IC}_{50}$  von 8,8  $\mu\text{M}$  und ein Hill-Koeffizient von  $-1,1$  und für KU14R eine  $\text{IC}_{50}$  von 31,9  $\mu\text{M}$  und ein Hill-Koeffizient von  $-1,5$ .

#### 4.2.5 Hemmung der $K_{ATP}$ -Kanalaktivität in intakten B-Zellen durch 300 $\mu$ M KU14R und 300 $\mu$ M Efaroxan

Da durch KU14R und Efaroxan in der unter 4.2.4 beschriebenen Messkonfiguration ein kompletter Schluss der  $K_{ATP}$ -Kanäle zu erreichen war, stellte sich die Frage, ob beide Substanzen auch in der physiologisch relevanten cell-attached Konfiguration in der Lage sind, einen nahezu vollständigen Kanalschluss zu erreichen.

In der cell-attached Konfiguration reduzierten 300  $\mu$ M KU14R die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität auf  $2,1 \% \pm 1,2$  ( $n = 4$ ). 300  $\mu$ M Efaroxan bewirkten in der cell-attached Konfiguration eine Reduktion der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität auf  $8,2 \% \pm 2,4$  ( $n = 9$ ). Diese Wirkungen unterschieden sich nicht signifikant ( $P = 0,13$ , t-Test). Daraufhin wurden die Wirkungen von 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M Efaroxan in der cell-attached Konfiguration bestimmt und eine Kurvenanpassung (curve-fit) durchgeführt (s. 4.1.3). Die  $EC_{50}$  lag für Efaroxan bei 9,9  $\mu$ M und der Hill-Koeffizienten bei -0,84

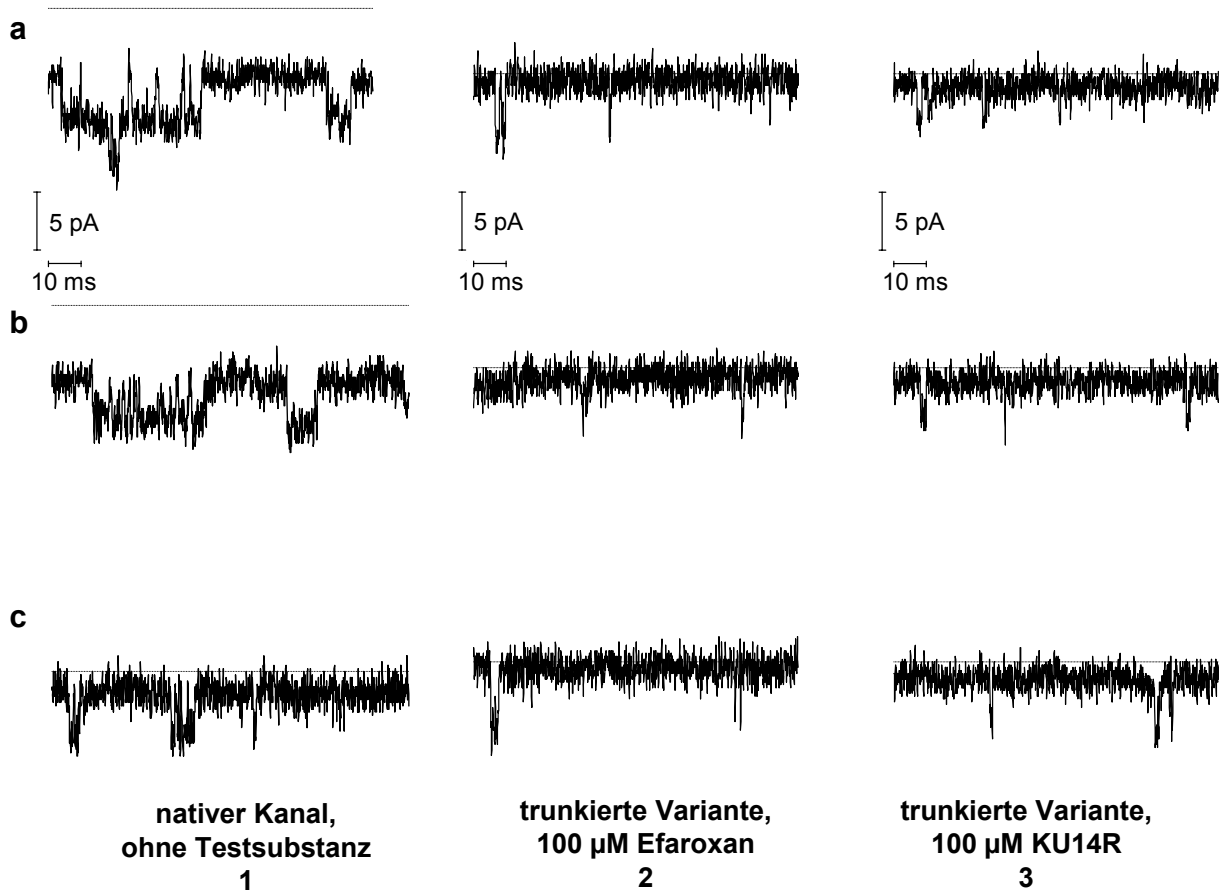


**Abbildung 4.18** Originalregistrierung der  $K_{ATP}$ -Kanal-blockierenden Wirkung von 300  $\mu$ M KU14R auf die Kanalaktivität in intakten Maus B-Zellen. Repräsentative Abbildung für 4 Versuche.



#### **4.2.6 Hemmung des heterolog exprimierten $K_{ir}6.2\Delta C26$ -Kanals in HEK293-Zellen durch Efaroxan und KU14R**

Von einigen Imidazolinen ist bekannt, dass sie den Schluss des  $K_{ATP}$ -Kanals durch eine direkte Wirkung an der porenbildenden Untereinheit,  $K_{ir}6.2$ , bewirken. Es sollte nun festgestellt werden, ob dieses auch für das Imidazol KU14R zutrifft. Dazu wurde die Wirkung von KU14R und Efaroxan auf die Aktivität einer C-terminal-trunkierten Variante der porenbildenden Untereinheit,  $K_{ir}6.2\Delta C26$ , geprüft. Diese Variante wird auch ohne die Anwesenheit des Sulfonylharnstoffrezeptors, SUR1, in die Plasmamembran integriert und zeigt dort Ionenkanalaktivität. Für diese Versuche wurde eine HEK293 Zelllinie verwendet. Diese war stabil mit  $K_{ir}6.2\Delta C26$  transfiziert worden (GROSSE-LACKMANN et al., 2003). Typisches Kennzeichen dieses Kanals ist eine deutlich kürzere mittlere Offenzeit verglichen mit der mittleren Offenzeit nativer  $K_{ATP}$ -Kanäle bei gleicher Stromamplitude. Diese Charakteristika wurden auch in den jetzigen Messungen bestätigt (s. Abbildung 4.19). Die Wirkungen von Efaroxan und KU14R auf die Aktivität von  $K_{ir}6.2\Delta C26$  wurde in der cell-attached Konfiguration bestimmt, um einen Vergleich mit der Wirkung an intakten B-Zellen zu ermöglichen (s. 4.2.2). 100  $\mu$ M Efaroxan reduzierten die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität des heterolog exprimierten  $K_{ir}6.2\Delta C26$ -Kanals auf  $21,4 \% \pm 5,4$  ( $n = 5$ ). 100  $\mu$ M KU14R reduzierten die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität des heterolog exprimierten  $K_{ir}6.2\Delta C26$ -Kanals auf  $45,2 \% \pm 10,3$  ( $n = 5$ ). Damit war der Effekt von Efaroxan und KU14R auf den  $K_{ir}6.2\Delta C26$ -Kanal nicht signifikant verschieden von der Wirkung der jeweiligen Substanz auf den nativen  $K_{ATP}$ -Kanal (Efaroxan:  $P = 0,77$ ; KU14R:  $P = 0,80$  jeweils t-Test).

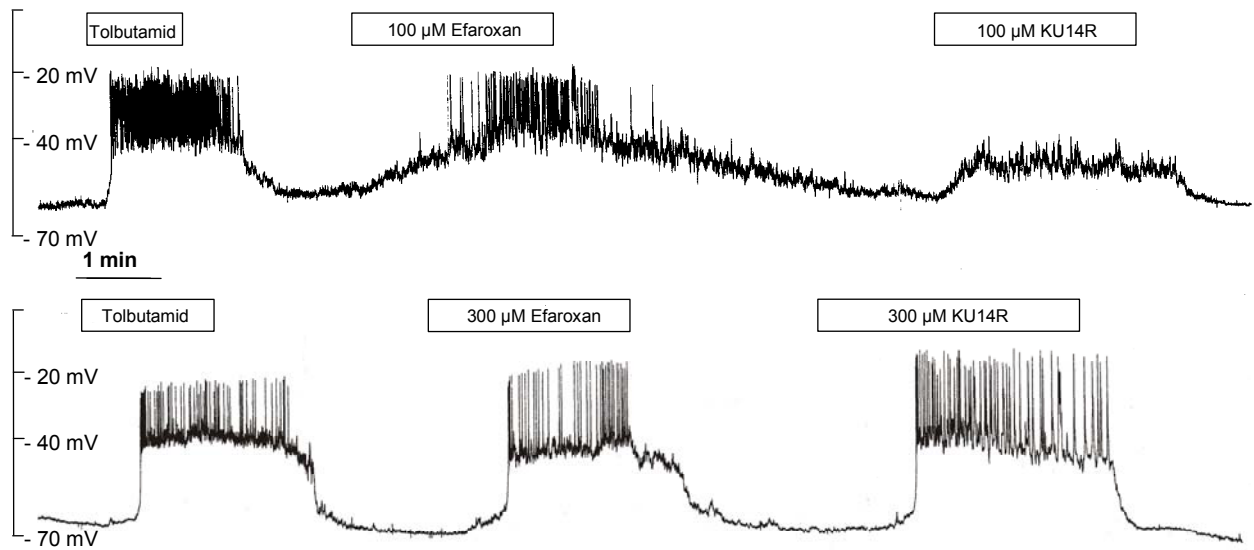


**Abbildung 4.19:** Originalregistrierung der Effekte von 100  $\mu$ M Efaroxan und 100  $\mu$ M KU14R in der cell-attached Konfiguration auf die trunkierte Variante des  $K_{ATP}$ -Kanals,  $K_{ir}6.2\Delta C26$ , exprimiert in HEK293 Zellen. Zum Vergleich gibt 1 a bis c das Öffnungsverhalten nativer  $K_{ATP}$ -Kanäle unter Kontrollbedingungen ohne Zugabe einer Testsubstanz in extrazellulärer Lösung zu 3 verschiedenen Zeitpunkten innerhalb eines Versuches wieder. In 2a und 3a ist das Verhalten des trunkierten Kanals vor Zugabe der Testsubstanz dargestellt. 2b zeigt den Einfluss von 100  $\mu$ M Efaroxan, 3b zeigt den Einfluss von 100  $\mu$ M KU14R. In 2c und 3c ist das Verhalten nach Auswaschen der Testsubstanz dargestellt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet einen Stromfluss von 0 pA. In Versuchsreihe 1 ist ein Leak-Strom zu bemerken, der im Versuchsverlauf geringer wird. Dieses ist am abnehmenden Abstand zu der gestrichelten Linie erkennbar. Die Versuche in 2 und 3 sind repräsentative Abbildungen für jeweils 5 Versuche.

#### **4.2.7 Wirkungen von Efaroxan und KU14R auf das Membranpotential von nahezu intakten B-Zellen**

Die deutlich depolarisierende Wirkung von 100  $\mu\text{M}$  KU14R in der whole-cell Konfiguration stimmte mit der Wirkung auf  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle in der gleichen Konfiguration überein, stand aber im Widerspruch zur ausbleibenden Steigerung der Insulinsekretion. Deswegen wurden Messungen des Membranpotentials in der perforated-patch Konfiguration durchgeführt. In dieser Konfiguration waren bei Depolarisation teilweise Aktionspotentiale zu beobachten. Deswegen wurde jeweils ein Wert für das Plateau der Depolarisation und ein Wert für die Spitze des Aktionspotentials ermittelt. Der Plateau-Wert gibt die Schwelle an, von der die Aktionspotentiale starten und der Spitzenwert gibt das maximale Ausmaß des Aktionspotentials an. 100  $\mu\text{M}$  KU14R führten in dieser Messkonfiguration zu keiner signifikanten Depolarisation. Ausgehend von einem Ruhemembranpotential von  $-63,7 \pm 2,6$  mV ( $n = 7$ ) depolarisierten 100  $\mu\text{M}$  KU14R das Plasmamembranpotential auf einen Plateauwert von  $-59,5 \pm 4,1$  mV ( $n = 6$ ). In 2 Versuchen deuteten sich Aktionspotentiale an, deren Spitzenwert bei  $-41,0 \pm 13,0$  mV lag. 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan bewirkten hingegen eine Depolarisation von  $-71,5 \pm 2,0$  mV ( $n = 6$ ) auf ein Plateau von  $-47,8 \pm 2,7$  mV ( $n = 6$ ). In 5 der 6 Versuche traten Aktionspotentiale auf, deren Spitzenwert bei  $-29,6 \pm 5,3$  mV lag. Der Effekt beider Substanzen in der perforated-patch Konfiguration war in dieser Konzentration signifikant unterschiedlich ( $P = 0,04$ , t-Test).

Wurde KU14R jedoch in einer Konzentration eingesetzt, die sowohl in der whole-cell-Konfiguration als auch in der cell-attached Konfiguration die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität nahezu vollständig hemmte (300  $\mu\text{M}$ ), so war auch in der perforated-patch Konfiguration eine signifikante Depolarisation auf ein Plateau von  $-44,9 \pm 2,7$  mV ( $n = 8$ ) zu beobachten. 300  $\mu\text{M}$  Efaroxan depolarisierten auf  $-46,6 \pm 2,7$  mV ( $n = 3$ ). In der Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  war die Wirkung beider Substanzen auf das Plasmamembranpotential also gleich effektiv ( $P = 0,73$ ; t-Test).



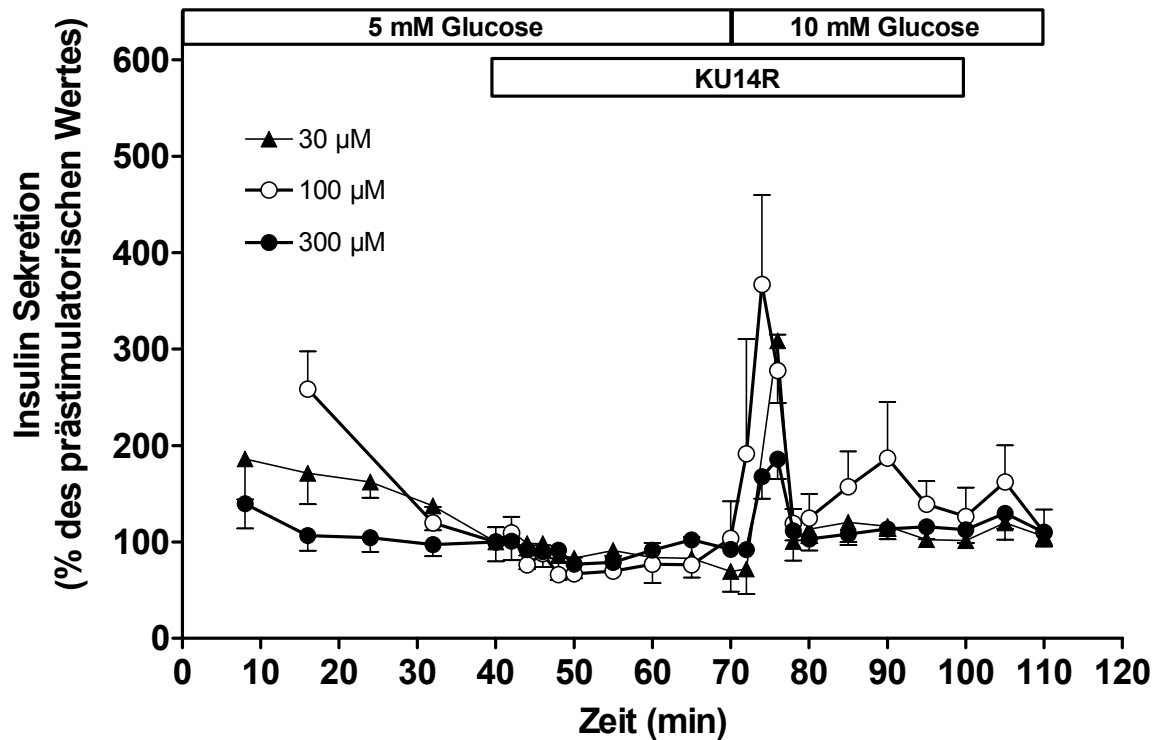
**Abbildung 4.20** Originalregistrierung des Membranpotentials in der perforated-patch Konfiguration. Die Abbildungen sind repräsentativ für 6 (100 µM) und 8 (300 µM) Versuche. Zum Vergleich ist zu Beginn der Registrierung der Effekt von 500 µM Tolbutamid angegeben. Deutlich erkennbar ist, dass es Phasen langandauernder Depolarisation (waves) gibt, von deren Niveau sich kurzfristige repetitive Depolarisationen (spikes) zeigen. Es wurde deshalb getrennt das Plateau der Depolarisationsphase und die Spitze der spikes ausgewertet.

| untersuchte Konzentration | Membranpotential           |                             |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|                           | Efaroxan                   | KU14R                       |
| 100 µM (Plateau)          | $-47,8 \pm 2,7$ mV (n = 6) | $-59,5 \pm 4,1$ mV (n = 6)  |
| 100 µM (Spitze)           | $-29,6 \pm 5,3$ mV (n = 5) | $-41,0 \pm 13,0$ mV (n = 2) |
| 300 µM (Plateau)          | $-46,6 \pm 2,7$ mV (n = 3) | $-44,9 \pm 2,7$ mV (n = 8)  |
| 300 µM (Spitze)           | $-26,4 \pm 2,8$ mV (n = 3) | $-28,5 \pm 3,7$ mV (n = 8)  |

**Tabelle 4.6** Effekte von Efaroxan und KU14R auf das Membranpotential in intakten B-Zellen gemessen in der perforated-patch Konfiguration. In der perforated-patch Konfiguration waren bei Depolarisation teilweise Aktionspotentiale zu beobachten. Deswegen wurde jeweils ein Wert für das Plateau des Aktionspotentials und ein Wert für die Spitze des Aktionspotentials angegeben. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM der jeweils in Klammern angegebenen Versuchszahl. Die unterschiedliche Versuchsanzahl bei Plateau- und Spitzen-Werten ergibt sich daraus, dass nicht an jeder Zelle Aktionspotentiale beobachtet wurden.

#### 4.2.8 Wirkungen von KU14R auf die Insulinsekretion in einer vollständig $K_{ATP}$ -Kanal-blockierenden Konzentration

Da 300  $\mu$ M KU14R an intakten B-Zellen eine komplette Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität und eine signifikante Depolarisation in der perforated-patch Konfiguration bewirkten, wurden mit dieser Konzentration erneut Perifusionsversuche zur Messung der Insulinsekretion durchgeführt, da erwartet werden konnte, dass in dieser Konzentration eine Steigerung der Insulinsekretion durch KU14R hervorgerufen werden müsste. 300  $\mu$ M KU14R bewirkten bei Zugabe zu 5 mM Glucose eine signifikante Reduktion der Sekretionsrate ( $P < 0,0001$ , t-Test). Der Vergleich der Integrale unter den Sekretionskurven (AUC) zeigte eine Reduktion der AUC zwischen Minute 16 und Minute 40 von 218,8 pg Insulin in Gegenwart von 5 mM Glucose alleine (Kontrolle) auf 181,8 pg Insulin zwischen Minute 42 und Minute 66 in Gegenwart von 5 mM Glucose und 100  $\mu$ M KU14R, welches 83 % der AUC unter Kontrollbedingungen entsprach. Die Erhöhung der Glucose-Konzentration auf 10 mM in Gegenwart von 300  $\mu$ M KU14R löste einen vorübergehenden Anstieg der Sekretionsrate auf maximal  $16,7 \pm 1,8$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 4$ ) aus. Nach 10 Minuten sanken die Sekretionswerte auf  $9,2 \pm 1,0$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 4$ ) ab. Diese Werte entsprachen den Werten in Gegenwart von 5 mM Glucose alleine, die  $8,2 \pm 0,4$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 4$ ) betrugen. Die Effekte von 100 und 300  $\mu$ M KU14R auf die Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus-Inseln waren auch im Spitzenwert nicht signifikant verschieden ( $P = 0,12$ ; t-Test mit Welch Korrektur). Auch 30  $\mu$ M KU14R lösten keine Steigerung der Insulinsekretion aus. Der Spitzenwert beim Wechsel von 5 auf 10 mM Glucose betrug in Gegenwart von 30  $\mu$ M KU14R  $14,3 \pm 3,0$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 4$ ). Für einen weiteren Vergleich wurden die Sekretionswerte auf die Sekretionsrate, die bei Minute 40 vor Zugabe von KU14R vorlagen, normalisiert (s. Abbildung 4.21). Diese Werte betrugen bei der Versuchsreihe mit 30  $\mu$ M KU14R  $4,6 \pm 0,9$  pg Insulin/min·Insel, bei 100  $\mu$ M KU14R  $4,5 \pm 0,7$  pg Insulin/min·Insel ( $n = 6$ ) und bei 300  $\mu$ M KU14R  $9,0 \pm 0,7$  pg Insulin/min·Insel. Bezogen auf diesen 100 % Wert wurde die Sekretionsrate durch Zugabe von 30  $\mu$ M KU14R auf maximal  $308,7 \pm 64,6$  % ( $n = 4$ ), durch 100  $\mu$ M KU14R auf  $366,9 \pm 92,9$  % ( $n = 6$ ) und durch 300  $\mu$ M KU14R auf  $186,0 \pm 20,3$  % ( $n = 4$ ) gesteigert. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant. Der Vergleich der Werte von 100 und 300  $\mu$ M KU14R liefert einen P-Wert von 0,12 (t-Test mit Welch Korrektur).



**Abbildung 4.21** Effekt auf die Insulinsekretion von KU14R (30  $\mu$ M geschlossene Dreiecke, 100  $\mu$ M, offene Kreise und 300  $\mu$ M, geschlossene Kreise). Frisch isolierte Pankreas-Inseln der Maus wurden mit Krebs-Ringer-Medium umströmt, das bis zu Minute 70 5 mM Glucose und von Minute 70 bis Minute 110 10 mM Glucose enthielt. Von Minute 40 bis Minute 100 waren 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M oder 300  $\mu$ M KU14R anwesend. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 – 6 Versuchen.

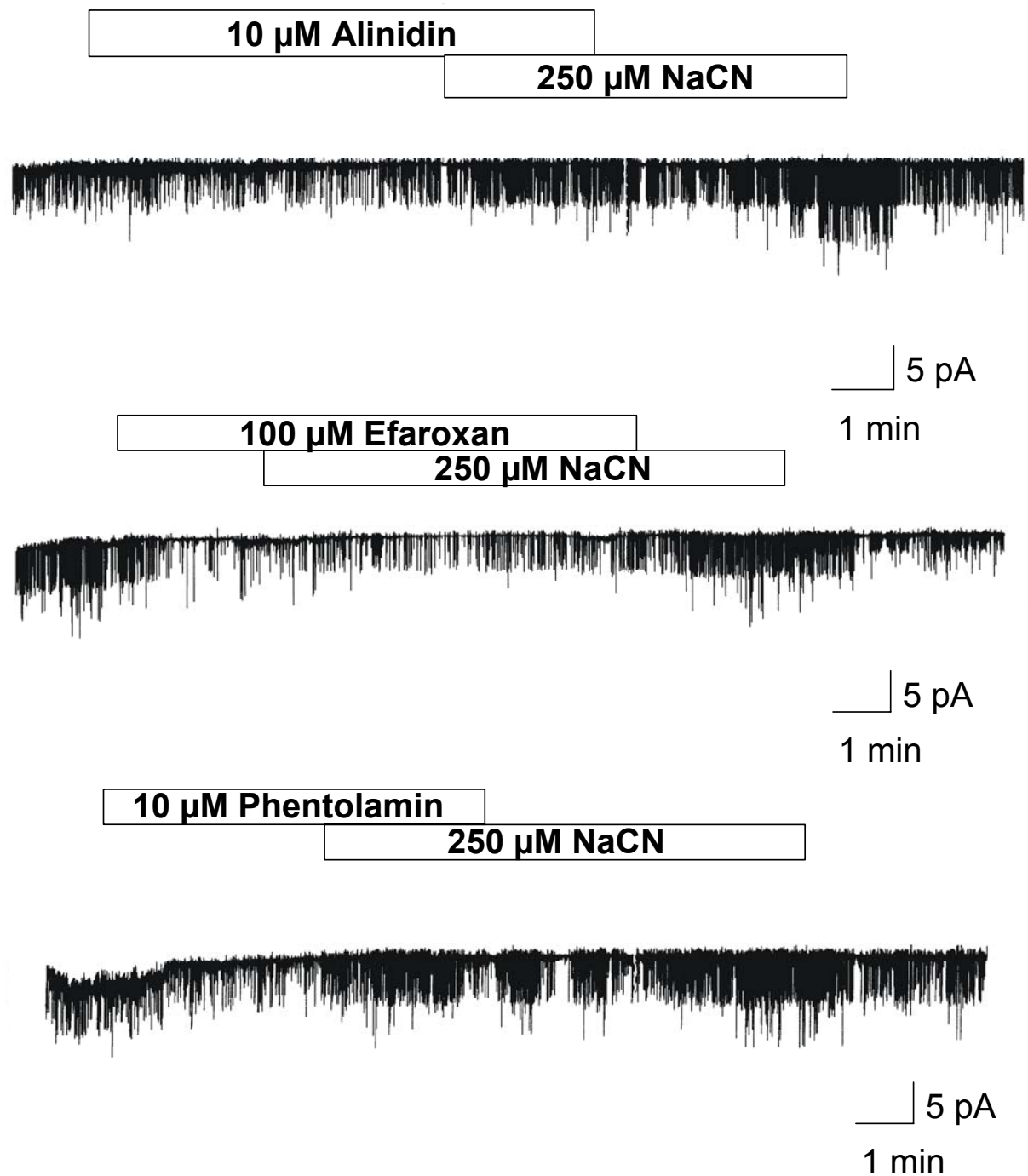
### 4.3 Einfluss des Energiestoffwechsels auf die Wirkung der Imidazoline

ATP-sensitive Kaliumkanäle werden durch ATP geschlossen. MgADP ist dagegen in der Lage  $K_{ATP}$ -Kanäle zu öffnen. Da ein Mangel an Energiesubstraten zu einem Absinken des ATP/ADP-Konzentrationsverhältnisses führt, kommt es bei zellulärem Energiemangel zu einer gesteigerten  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität. Da dieses Phänomen als Schutzmechanismus interpretiert wird, ist es von Bedeutung, herauszufinden, ob diese Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen unter Energiemangel auch in Gegenwart von Imidazolinen stattfindet.

#### 4.3.1 Einfluss der Blockade der Atmungskette durch Natriumcyanid auf die $K_{ATP}$ -Kanal-blockierende Wirkung der Imidazoline

In dieser Arbeit sollte die Auswirkung der metabolischen Blockade mit Natriumcyanid (NaCN) auf die durch Imidazoline bewirkte Hemmung der  $K_{ATP}$  Kanalfunktion durch Patch-Clamp Messungen an intakten B-Zellen im cell-attached Modus gemessen werden.

Alle drei Testsubstanzen, Efaroxan, Phentolamin und Alinidin in unterschiedlichen Konzentrationen, reduzierten die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität (s. Abbildung 4.22 und Tabelle 4.7). 10  $\mu$ M Efaroxan reduzierten die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität auf  $45,4 \pm 4,8$  % ( $n = 9$ ), 100  $\mu$ M Efaroxan auf  $10,8 \pm 3,1$  % ( $n = 7$ ). Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant von der Reduktion durch 100  $\mu$ M Efaroxan auf 19,1 %, die in der Versuchsreihe bei Vergleich der Wirkung von KU14R erhalten wurde ( $P = 0,20$ , t-Test). Die zusätzliche Anwesenheit von 250  $\mu$ M Natriumcyanid erhöhte die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität signifikant auf  $96,1 \pm 17,6$  % in Gegenwart von 10  $\mu$ M Efaroxan ( $P = 0,02$ ; t-Test mit Welch Korrektur) und auf  $183 \pm 61,11$  % in Gegenwart von 100  $\mu$ M Efaroxan ( $P = 0,04$ ; t-Test mit Welch Korrektur). Die Reduktion der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität durch 10  $\mu$ M Phentolamin auf  $41,0 \pm 6,1$  % ( $n = 5$ ) wurde durch die zusätzliche Anwesenheit durch 250  $\mu$ M Natriumcyanid nicht signifikant auf  $158,7 \pm 54,3$  % ( $P = 0,1$ ; t-Test mit Welch Korrektur) gesteigert. 10  $\mu$ M Alinidin reduzierten die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität auf  $31,7 \pm 10,9$  % ( $n = 6$ ). Diese wurde durch die zusätzliche Anwesenheit von 250  $\mu$ M Natriumcyanid signifikant auf  $169,0 \pm 43,5$  % gesteigert ( $P = 0,03$ ; t-Test mit Welch Korrektur). Bei Wegnahme der Imidazoline trat in Gegenwart von beiden Efaroxan-Konzentrationen und Alinidin eine weitere deutliche Zunahme der Kanalaktivität auf. Die Wegnahme von Phentolamin hingegen bewirkte im Versuchsverlauf keine weitere Zunahme der Kanalaktivität. Bei Auswaschen des Natriumcyanids wurde die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität wieder reduziert.



**Abbildung 4.22** Originalregistrierung der Effekte von 10  $\mu$ M Alinidin, 100  $\mu$ M Efaroxan und 10  $\mu$ M Phentolamin und der Kombination aus jeweils 10  $\mu$ M Alinidin, 100  $\mu$ M Efaroxan, 10  $\mu$ M Phentolamin und 250  $\mu$ M NaCN und 250  $\mu$ M NaCN alleine auf das Öffnungsverhalten der  $K_{ATP}$ -Kanäle in der cell-attached Konfiguration. Die Abbildungen sind repräsentativ für jeweils 6, 7 und 5 Versuche.

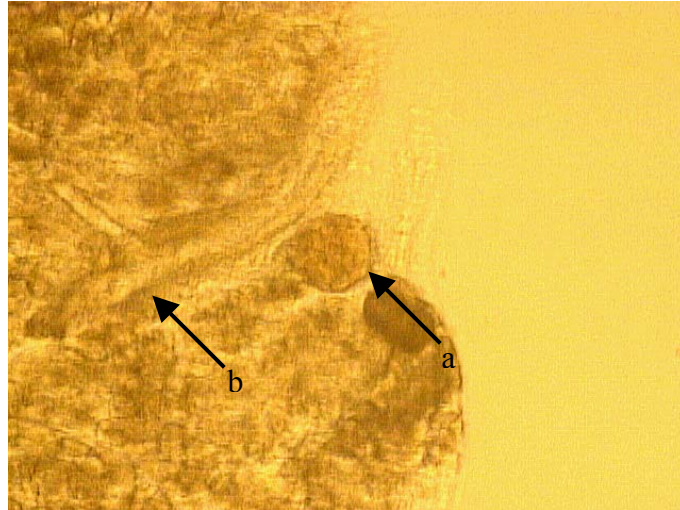


| Untersuchte Bedingung         | Relative $K_{ATP}$ -Kanalaktivität |                                  |                               |                                |
|-------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|                               | 10 $\mu$ M Efaroxan                | 100 $\mu$ M Efaroxan             | 10 $\mu$ M Phentolamin        | 10 $\mu$ M Alinidin            |
| Imidazolin                    | 45,4 % $\pm$ 4,8<br>(n = 9)        | 10,8 % $\pm$ 3,1<br>(n = 7)      | 41,0 % $\pm$ 6,1<br>(n = 5)   | 31,7 % $\pm$ 10,9<br>(n = 6)   |
| Imidazolin + 250 $\mu$ M NaCN | 96,1 % $\pm$ 17,6<br>(n = 9)       | 183,4 % $\pm$ 61,1<br>(n = 7)    | 158,7 % $\pm$ 54,3<br>(n = 5) | 169,0 % $\pm$ 43,5<br>(n = 6)  |
| 250 $\mu$ M NaCN              | 403,9 % $\pm$ 145,2<br>(n = 7)     | 3444,1 % $\pm$ 1295,8<br>(n = 7) | 184,1 % $\pm$ 84,2<br>(n = 5) | 389,3 % $\pm$ 206,4<br>(n = 3) |
| EZ nachher                    | 189,3 % $\pm$ 84,2<br>(n = 5)      | 207,9 % $\pm$ 149,3<br>(n = 6)   | 89,0 % $\pm$ 38,7<br>(n = 4)  | 174,1 % $\pm$ 100,1<br>(n = 2) |

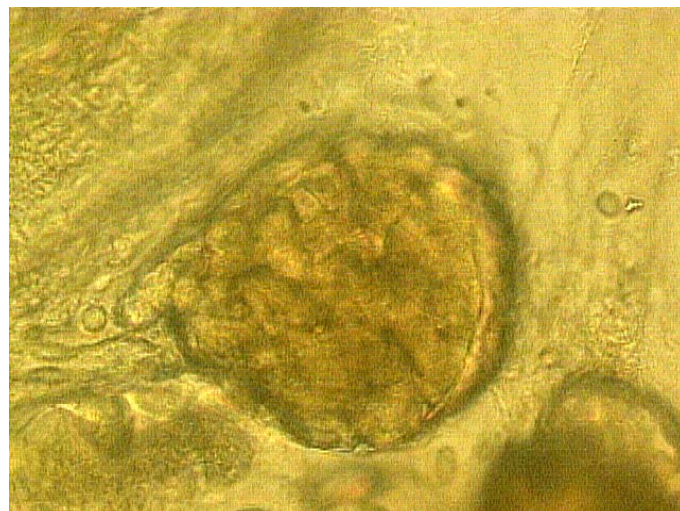
**Tabelle 4.7** Effekte von 250  $\mu$ M NaCN auf die Reduktion der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität durch Imidazoline an B-Zellen der Maus gemessen in der cell-attached Konfiguration. Die Einzelkanalaktivität wurde bezogen auf die Aktivität vor Zugabe der Testsubstanz (= 100 %). Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM der jeweils in Klammern angegebenen Versuchszahl. Die Reduktion der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität durch die Imidazoline war in allen Fällen signifikant ( $P < 0,05$ , t-Test mit Welch Korrektur). Der öffnende Effekt durch 250  $\mu$ M NaCN in Gegenwart der Imidazoline war signifikant für 10  $\mu$ M Alinidin und für beide Konzentrationen von Efaroxan ( $P < 0,05$ , t-Test mit Welch Korrektur). Für 10  $\mu$ M Phentolamin war der öffnende Effekt durch 250  $\mu$ M NaCN in Gegenwart des Imidazolins nicht signifikant ( $P = 0,1$ ; t-Test mit Welch Korrektur).

#### 4.4 Messungen des Membranpotentials an B-Zellen im Zellverband der Langerhans'schen Inseln und Wirkung von Efaroxan

Langerhans'sche Inseln konnten innerhalb des Gewebeschnittes gut identifiziert werden. Nach der Einstellung des Blickfeldes auf eine Insel wurde versucht, die Patch-Pipette an die Insel anzunähern und an einer Zelle ein Seal herzustellen.



**Abbildung 4.23** Mikroskopisches Bild eines durch Agarose stabilisierten Pankreasschnitts. Es zeigt eine Langerhans'sche Insel innerhalb des Gewebeverbandes in der 100fachen Vergrößerung. Der Pfeil a zeigt auf die Insel, die neben einem Blutgefäß (Pfeil b) lokalisiert ist.



**Abbildung 4.24** Mikroskopisches Bild eines durch Agarose stabilisierten Pankreasschnitts. Es zeigt eine Langerhans'sche Insel innerhalb des Gewebeverbandes in der 400fachen Vergrößerung. Ab dieser Vergrößerung sind einzelne Zellgrenzen zu erkennen.



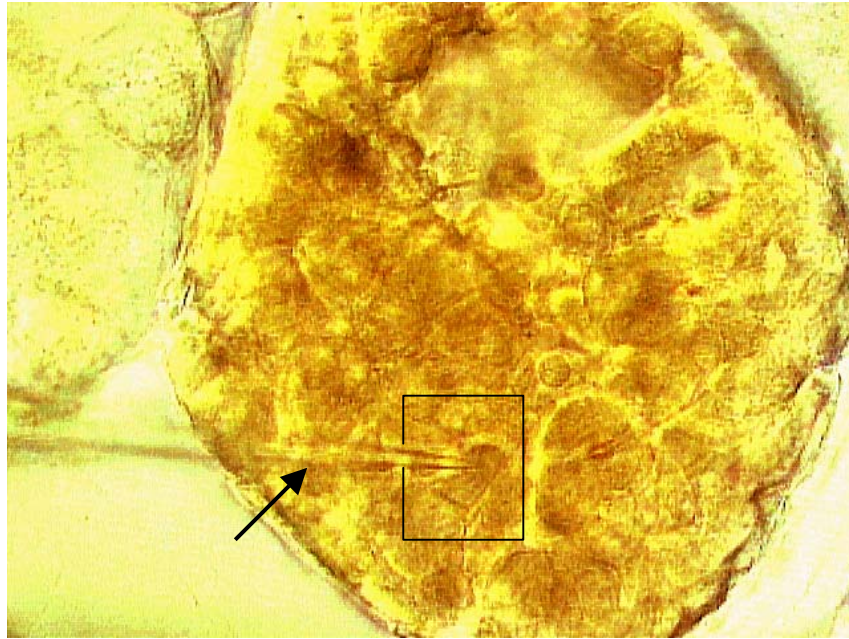
**Abbildung 4.25** Mikroskopisches Bild eines durch Agarose stabilisierten Pankreasschnitts. Es zeigt eine Langerhans'sche Insel innerhalb des Gewebeverbandes in der 630fachen Vergrößerung. Bei dieser Vergrößerung kann die Patch-Pipette direkt auf einzelne Zellen positioniert werden.

Probleme bei der Technik traten auf, wenn sehr viele abgerundete Zellen auf der Oberfläche der Inseln vorhanden waren. Mit diesen Zellen war kein Seal zu erhalten. Sie wurden als apoptotisch angesehen (s. Abbildung 4.26) und es wurde versucht, Zellen zu patchen, die mit ihren Nachbarzellen noch in direktem Kontakt standen und einen polygonalen Umriss aufwiesen (s. Abbildung 4.27).



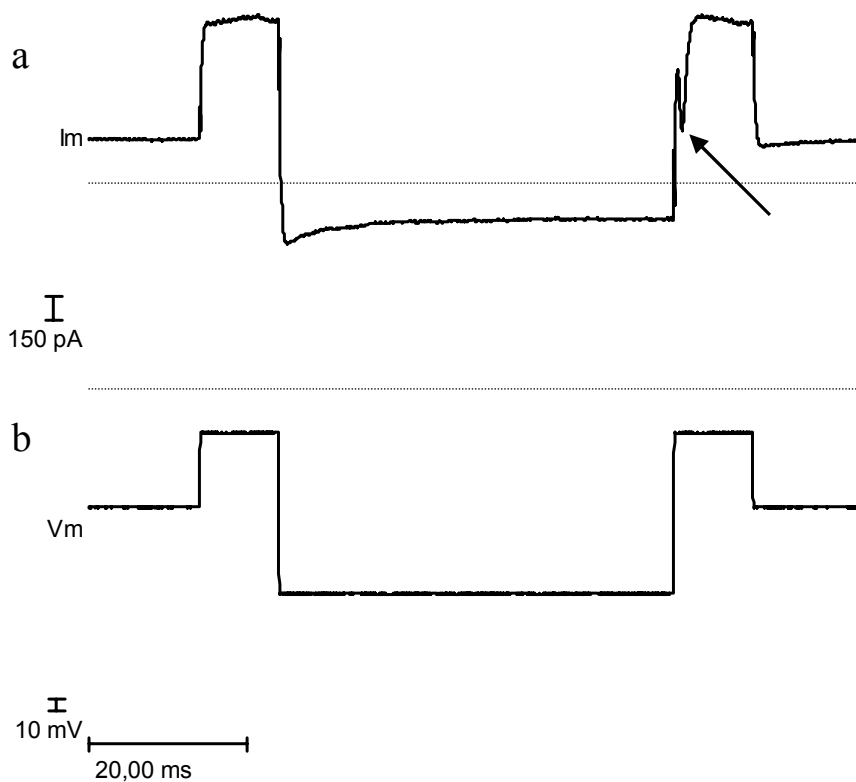
**Abbildung 4.26** Mikroskopisches Bild eines durch Agarose stabilisierten Pankreasschnitts. Es zeigt eine Langerhans'sche Insel (630fache Vergrößerung). Der Pfeil zeigt auf eine abgerundete Zelle an der Oberfläche der Insel, an der kein Seal zu erreichen war. Ursache für die Abrundung und mangelnde Sealbildungsfähigkeit ist wahrscheinlich eine beginnende Apoptose in solchen randständigen Zellen.





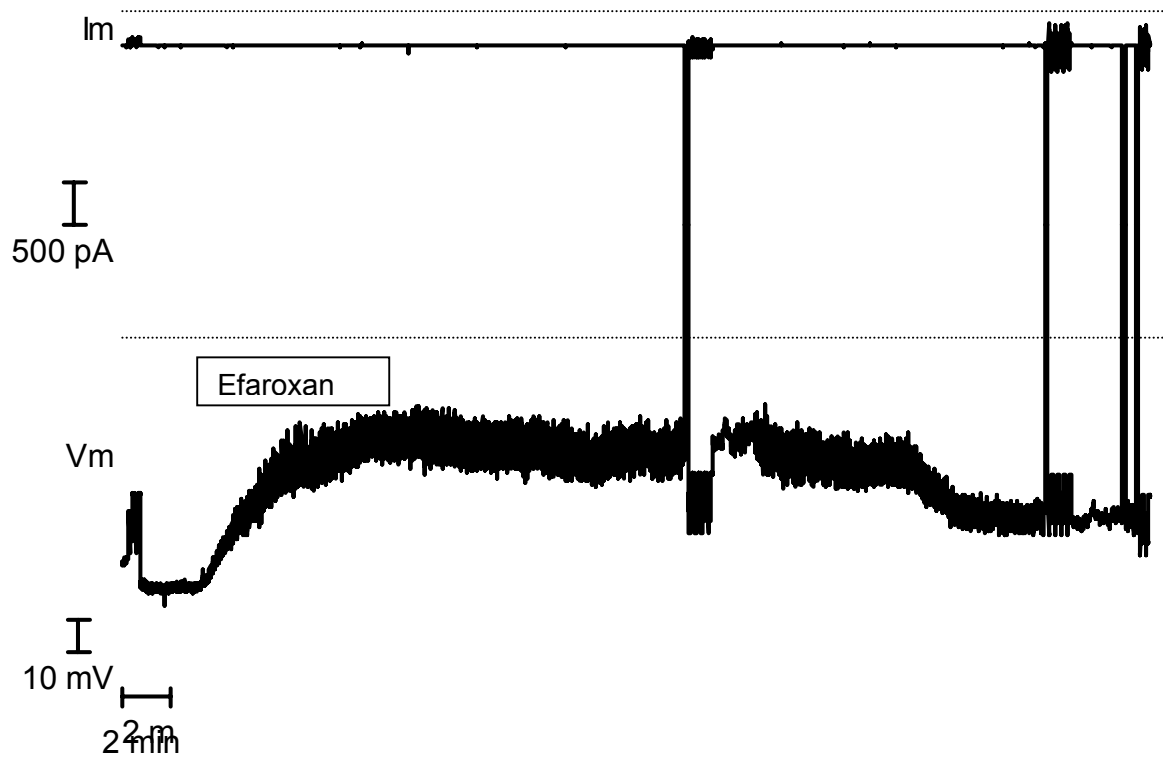
**Abbildung 4.27** Mikroskopisches Bild eines durch Agarose stabilisierten Pankreasschnitts. Es zeigt eine Langerhans'sche Insel (630fache Vergrößerung), an die gerade eine Patch-Pipette herangeführt worden ist. Der schwarz umrandete Kasten markiert einen Bereich, in dem die Zellen polygonale Umrisse aufweisen und für Patch-Clamp-Untersuchungen verwendet werden konnten.

Nach Sealherstellung wurde vor der Versuchsdurchführung zur Identifizierung von B-Zellen innerhalb der intakten Insel ein von Speier et al. (SPEIER, 2004) entwickeltes Voltage-Clamp Stimulationsprotokoll eingesetzt. Dieses orientiert sich an der von Göpel et al, 1999 beschriebenen Eigenschaft, dass B-Zellen einen inaktivierbaren Natriumstrom aufweisen. Bei B-Zellen muss die Zelle vor der Depolarisation, die einen Natriumstrom auslösen soll, hyperpolarisiert sein (s. Abbildung 4.28). A-Zellen reagieren bei jeder Depolarisation auf  $-20$  mV mit einem Natriumstrom (GÖPEL et al., 1999).



**Abbildung 4.28** Darstellung des verwendeten Stimulationsprotokolls zur Identifizierung von B-Zellen innerhalb der intakten Insel. Die Zelle wird wie in b gezeigt bei  $-80$  mV geclamped und dann auf  $-20$  mV depolarisiert. Bei einer B-Zelle ist unter diesen Bedingungen der Natriumstrom inaktiv. Dann wird die Zelle auf  $-120$  mV hyperpolarisiert und anschließend wieder auf  $-20$  mV depolarisiert. Die vorangegangene Hyperpolarisation hat dafür gesorgt, dass unter diesen Bedingungen der Natriumstrom in B-Zellen aktivierbar ist (a). In der Abbildung ist der einwärts gerichtete Natriumstrom durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Bei Messung des Membranpotentials reagierten die B-Zellen im Zellverband der Inseln auf die Zugabe von  $100 \mu\text{M}$  Efaroxan mit einer Depolarisation um  $31,52 \pm 4,0$  mV ( $n = 3$ ) (s. Abbildung 4.29, vgl. Tabelle 4.4). Damit ist das Ausmaß der Depolarisation durch  $100 \mu\text{M}$  Efaroxan signifikant geringer als das Ausmaß der Depolarisation durch  $100 \mu\text{M}$  Efaroxan in der isolierten und kultivierten B-Zelle ( $P = 0,02$ , t-Test). Die Untersuchungen an Gewebeschnitten zeigten für den Effekt des Efaroxans eine deutlich langsamere Reversibilität in der whole-cell-Konfiguration als die Untersuchungen des Efaroxaneffekts an isolierten B-Zellen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Anreicherung des Imidazolins im exokrinen Gewebe sein, die eine längere Auswaschphase bedingt.



**Abbildung 4.29** Originalregistrierung des Effekts von  $100 \mu\text{M}$  Efaroxan auf das Membranpotential von B-Zellen innerhalb des Zellverbandes einer Langerhans'schen Insel im Gewebeschnitt. Die obere Spur zeigt die Stromantwort auf ein vorgegebenes Haltepotential und die untere Spur zeigt das Membranpotential, wenn der Stromfluss auf 0 pA gehalten wird.

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit sollte neue Einblicke in den Wirkmechanismus der Imidazoline der ersten Generation liefern. Die ursprüngliche Hypothese zum Wirkmechanismus der Imidazoline ging von der Bindung an einen membranständigen Rezeptor und einer sich anschließenden intrazellulären Signalkaskade aus. Diese intrazelluläre Signalkaskade sollte unter anderem einen Schluss ATP-empfindlicher Kalium-Kanäle bewirken.

### 5.1 Untersuchungen zur Glucoseselektivität der Imidazoline der ersten Generation

Einige Imidazoline zeigen eine Steigerung der Insulinsekretion nur bei erhöhten Glucosekonzentrationen (MORGAN, 1999). Das erste Imidazolin für welches diese glucoseselektive Eigenschaft gezeigt wurde ist RX871024 (ZAITSEV et al., 1996). Allerdings erkannten Zaitsev et al. auch, dass die Substanz RX871024, wenn sie in Konzentrationen über 50  $\mu\text{M}$  eingesetzt wird, ihre glucoseselektive Eigenschaft bezüglich des insulinsekretionssteigernden Effekts verlor. Hieraus entwickelte sich die Hypothese, dass Imidazoline die keine  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal-hemmende Wirkung mehr haben, Substanzen mit konstanter glucoseselektiver Wirkcharakteristik sein müssten (BERGGREN und EFENDIC, 2001). Tatsächlich gelang es, Imidazoline zu entwickeln, die keinen Effekt mehr auf  $K_{\text{ATP}}$ -Kanäle aufweisen und dennoch die Insulinsekretion steigern. Sie werden als Imidazoline der 2. Generation bezeichnet (EFENDIC et al., 2002).

Es bleibt die Frage, ob alle  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal-blockierende Imidazoline qualitativ gleich wirken und ob sich die Unterschiede zwischen ihnen nur auf ihre Potenz der insulinsekretionssteigernden Wirkung beziehen. Bisher wurde der Zusammenhang zwischen  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal-schließender Wirkung und Insulinsekretion bei basalen Glucosewerten nicht eindeutig gezeigt. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Frage zu klären, inwieweit auch Imidazoline mit Wirkungen auf den  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal eine glucoseselektive Steigerung der Insulinsekretion bewirken können.

Hinsichtlich der Glucoseselektivität der Steigerung der Insulinsekretion ließ sich bei den Substanzen RX871024 und Efaroxan eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit beobachten. 10  $\mu\text{M}$  RX871024 zeigten bei Messungen zur Beeinflussung der Insulinsekretion in isolierten Inseln eine glucoseselektive Steigerung der Insulinsekretion (s. Abbildung 4.5), wohingegen bei 100  $\mu\text{M}$  RX871024 der größte Teil der Steigerung der Insulinsekretion schon in Gegenwart von 5 mM Glucose erfolgte (s. Abbildung 4.6). Die Sekretionskurve ähnelte in ihrem Verlauf dem Verlauf einer durch hohe Kalium-Konzentration mit nachfolgender Erhöhung der Glucose-Konzentration ausgelösten Sekretionskurve (RUSTENBECK, unveröffentlichte Beobachtung). 10  $\mu\text{M}$  Efaroxan zeigten keine Steigerung der

Insulinsekretion (s. Abbildung 4.1). Bei 30  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan wurde eine glucoseselektive Steigerung der Insulinsekretion beobachtet (s. Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3). Bei 500  $\mu\text{M}$  Efaroxan ging diese Eigenschaft verloren. Die Steigerung der Insulinsekretion erfolgte schon in Gegenwart von 5 mM Glucose (s. Abbildung 4.4).

Phentolamin zeigte im Gegensatz hierzu keine glucoseselektive Steigerung der Insulinsekretion. Schon 10  $\mu\text{M}$  Phentolamin steigerten sie in Gegenwart von 5 mM Glucose (RUSTENBECK et al., 1999). Die Sekretionskurve, die unter Einfluss von 100  $\mu\text{M}$  Phentolamin in der vorliegenden Arbeit erhalten wurde, unterschied sich deutlich von der durch 100  $\mu\text{M}$  RX871024 erhaltenen Sekretionskurve (s. Abbildung 4.6). Die Phentolamin-Wirkung setzte wie bei RX871024 zwar schon bei 5 mM Glucose ein, war allerdings noch nicht maximal, sondern konnte durch Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM noch deutlich gesteigert werden. Auch bei der mit 500  $\mu\text{M}$  Efaroxan erhaltenen Sekretionskurve konnte durch Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM eine deutliche Steigerung der Insulinsekretionsrate erreicht werden.

Beim Vergleich der drei Imidazoline blieb zu klären, ob die glucoseselektive Steigerung durch RX871024 und Efaroxan in niedrigen Konzentrationen mit der  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalschließenden Wirkung korrelierte. 10  $\mu\text{M}$  RX871024 reduzierten die  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität auf 17,5 %. 30  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan reduzierten sie auf jeweils 34,0 % und 19,1 %. 100  $\mu\text{M}$  RX871024, 100  $\mu\text{M}$  Phentolamin und 300  $\mu\text{M}$  Efaroxan reduzierten die  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität auf jeweils 4,3 %, 3,7 % und 8,2 %. Auf den ersten Blick könnte hieraus die Vermutung abgeleitet werden, dass mit zunehmender Wirkung auf den  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalschluss die glucoseselektive Steigerung der Insulinsekretion tatsächlich abnimmt.

Aber trotz nahezu identischer Wirkungen auf den Schluss der  $K_{\text{ATP}}$ -Kanäle gab es einen Unterschied zwischen den durch Efaroxan, RX871024 und Phentolamin (jeweils 100  $\mu\text{M}$ ) ausgelösten Depolarisationen (s. Abbildung 4.9 und Tabelle 4.2). Die durch 100  $\mu\text{M}$  RX871024 ausgelöste Depolarisation war signifikant stärker als die durch jeweils 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan und 100  $\mu\text{M}$  Phentolamin ausgelösten Depolarisationen (s. Tabelle 4.2). Für Imidazoline wurde gezeigt, dass sie hemmend auf „delayed rectifier Kaliumkanäle“ wirken (IBBOTSON et al., 1998). Diesen wird eine Beteiligung an der Repolarisation des Membranpotentials zugeschrieben (DUNNE et al., 1994; ROE et al., 1996). Vorstellbar ist, dass RX871024 eine stärkere Hemmung auf diese „delayed rectifier Kaliumkanäle“ ausübt als Efaroxan und Phentolamin und daher die Depolarisation durch RX871024 länger und stärker ausgeprägt ist als die durch Efaroxan und Phentolamin bewirkten Depolarisationen.



Die insulinsekretionssteigernden Wirkungen von 100  $\mu\text{M}$  RX871024, 100  $\mu\text{M}$  Phentolamin und 500  $\mu\text{M}$  Efaroxan sind ebenfalls trotz nahezu identischer Wirkungen auf  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle deutlich verschieden. 100  $\mu\text{M}$  RX871024 bewirken schon in Gegenwart von 5 mM Glucose die Steigerung der Sekretion auf ein Maximum innerhalb von 10 Minuten. Nachfolgend sinkt die Sekretionsrate kontinuierlich ab und kann auch durch eine Erhöhung der Glucosekonzentration nur vorübergehend geringfügig wieder angehoben werden.

Möglicherweise hemmt RX871024 den Effekt von 10 mM Glucose. Hierfür könnten ionale Mechanismen verantwortlich sein, die durch RX871024 ausgelöst werden und eine nachfolgende Stimulation durch Glucose hemmen. Solche hemmenden Mechanismen ausgelöst durch eine Stimulation der Sekretion ohne gesteigertes Nährstoffangebot wurden als „time-dependent inhibition“ durch NESHER und CERASI beschrieben (NESHER und CERASI, 1987 und 2002). Die dauerhafte Steigerung der Insulinsekretion, die durch Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 auf 10 mM in Gegenwart von Phentolamin oder Efaroxan zu Stande kam, könnten als Mechanismen einer „time-dependent potentiation“ verstanden werden (NESHER und CERASI, 1987 und 2002).

Die durch Efaroxan erhaltene Sekretionskurve konnte durch Einsatz von 500  $\mu\text{M}$  Efaroxan nicht in die Form einer durch RX871024 hervorgerufenen Sekretionskurve überführt werden. Die deutliche Steigerung der Sekretionsrate bei Erhöhung der Glucosekonzentration in Gegenwart von Efaroxan blieb erhalten. Efaroxan hat somit ein anderes Wirkspektrum als RX871024 und ist nicht nur ein weniger potentes Analogon.

Für RX871024 kann ein  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal unabhängiger Effekt angenommen werden, da 2001 von Efanov et al. gezeigt wurde, dass die Substanz in SUR1 defizienten Mäusen, also Mäusen ohne funktionsfähige  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle, eine Steigerung der Insulinsekretion bewirkte (EFANOV et al., 2001b). Dieser  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal unabhängige Effekt kann aber nicht die Erklärung für die Glucoseselektivität sein, da in SUR1 knock-out Mäusen durch RX871024 die Sekretion auch bei basaler Glucose gesteigert wurde. Allerdings scheint bei SUR1 knock-out Mäusen nicht nur der „*amplifying pathway*“ intakt, sondern auch der „*triggering pathway*“ unter bestimmten Umständen aktivierbar zu sein (NENQUIN et al., 2004). Für Efaroxan sind die Effekte auf SUR1 knock-out Inseln noch zu überprüfen. Ein  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal unabhängiger Effekt von Efaroxan wurde von der Arbeitsgruppe um Morgan gezeigt, so dass eine sekretionssteigernde Wirkung zu erwarten ist (CHAN et al., 2001).

Der erstphasenartige Anstieg der Insulinsekretion, wenn die Glucosekonzentration in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan von 5 auf 10 mM angehoben wurde, ist nicht durch einen Calcium-Anstieg erklärbar (BLECK et al., 2004). Die Depolarisation und der Anstieg der

cytosolischen Calcium-Konzentration erfolgten schon in Gegenwart von 5 mM Glucose. Es kann also die Hypothese aufgestellt werden, dass der „erstphasenartige“ Anstieg nicht auf einem Anstieg der cytosolischen Calcium-Konzentration beruht, sondern durch andere, metabolisch bedingte Signale ausgelöst wird.

Diese Signale könnten sich auch auf die Oszillationen des Membranpotentials auswirken. Da die Oszillationen des Membranpotentials bei hohen Glucosekonzentrationen verschwinden, liegt die Vermutung nahe, dass diese metabolisch reguliert sein könnten und die Glucoseselektivität der Imidazoline beeinflussen könnten.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch die Reversibilität des Substanzeffekts einen Einfluss auf das Auftreten von Oszillationen im Membranpotential haben könnte. Mit steigender Reversibilität des Substanzeffekts lassen sich vermehrt Oszillationen während der Langzeitversuche beobachten. Am häufigsten wurden Oszillationen des Membranpotentials bei den durch Efaroxan bewirkten Depolarisationen beobachtet, gefolgt von den durch RX871024 ausgelösten Depolarisationen, wohingegen bei den durch Phentolamin bewirkten Depolarisationen in keinem Fall Oszillationen des Membranpotentials beobachtet wurden.

## **5.2 Vergleich der Wirkungen von Efaroxan und seinem Imidazol-Analogon KU14R, einem vermeintlichen Imidazolin-Antagonisten**

Die Hypothese eines  $I_3$ -Rezeptors an der B-Zelle des Pankreas beruht zur Zeit unter anderem darauf, dass für die Substanz KU14R die Fähigkeit beschrieben wurde, die durch Imidazoline bewirkte Steigerung der Insulinsekretion zu antagonisieren. Für diese Fähigkeit soll die Eigenschaft von KU14R, die durch Imidazoline geschlossenen  $K_{ATP}$ -Kanäle wieder öffnen zu können, verantwortlich sein (CHAN et al., 1998b). Angesichts der vorliegenden Ergebnisse, die kein Öffnen von durch Imidazoline geschlossenen  $K_{ATP}$ -Kanälen, das Ausbleiben einer Repolarisation des durch Imidazoline depolarisierten Membranpotentials und fehlender Hemmung der durch Imidazoline gesteigerte Insulinsekretion durch KU14R zeigten, muss diese Hypothese in Frage gestellt werden.

Im Gegensatz zu der Arbeitsgruppe von Morgan, die in den elektrophysiologischen Untersuchungen KU14R in einer 10-fach höheren Konzentration als Efaroxan verwendete (CHAN et al., 1998b), wurden in der vorliegenden Arbeit beide Substanzen in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt, um einen Antagonismus in Bezug auf die  $K_{ATP}$ -Kanalblockierende Wirkung und die Insulinsekretion zu überprüfen. Es ist durchaus möglich, dass bei Vorliegen eines kompetitiven Antagonismus KU14R im Überschuss vorhanden sein müsste, um antagonistisch wirksam zu werden. Da aber äquimolare Konzentrationen von jeweils 100  $\mu\text{M}$  in den von der Gruppe um Morgan durchgeführten Sekretionsuntersuchungen eine antagonistische Wirkung zeigten, wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls äquimolare Konzentrationen von jeweils 100  $\mu\text{M}$  in den Messungen zum Sekretionsverhalten sowie in den elektrophysiologischen Untersuchungen eingesetzt.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten für 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan eine Reduktion der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität in intakten B-Zellen auf 19 % und für die Kombination aus je 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan und KU14R eine Reduktion auf 12 %. Morgan beschreibt für den Effekt von 10  $\mu\text{M}$  Efaroxan eine Reduktion der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität auf 4 %. Diese hemmende Wirkung wurde durch die Kombination von 10  $\mu\text{M}$  Efaroxan und 100  $\mu\text{M}$  KU14R deutlich vermindert. Es resultierte nur noch eine  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität von 25 %. Diese Unterschiede zu den vorliegenden Ergebnissen könnte durch die unterschiedlichen Messkonfigurationen bedingt sein (cell-attached Konfiguration in der vorliegenden Arbeit gegenüber inside-out Messungen in der Untersuchung durch die Arbeitsgruppe um Morgan). Allerdings wurde bei der vorliegenden Arbeit kein Einfluss der Messkonfiguration auf die  $K_{ATP}$ -Kanal schließende Wirkung des Efaroxan festgestellt.

Durch die Arbeitsgruppe um Morgan wurden für KU14R auch hemmende Effekte auf den  $K_{ATP}$ -Kanal beschrieben. Für 100  $\mu\text{M}$  KU14R, die einzige untersuchte Konzentration, wurde eine Reduktion der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität auf 28 % publiziert. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten für 100  $\mu\text{M}$  KU14R in der intakten Zelle eine Reduktion der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität auf 50 %.

Bisher lagen keine Daten zu einer Konzentrationsabhängigkeit der  $K_{ATP}$ -Kanal blockierenden Wirkung durch KU14R vor. Die Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungskurve für die schließende Wirkung auf  $K_{ATP}$ -Kanäle in der whole cell Konfiguration zeigte in der vorliegenden Arbeit für KU14R eine  $IC_{50}$  von 31,9  $\mu\text{M}$  (Hill-Koeffizient -1,5) und für Efaroxan eine  $IC_{50}$  von 8,8  $\mu\text{M}$  (Hill-Koeffizient -1,1). Der höhere Hill Koeffizient von KU14R lässt sich eventuell über eine höhere Lipophilie und damit einer Anreicherung in der Membran der B-Zelle erklären. Es zeigte sich, dass mit KU14R genau wie mit Efaroxan ein kompletter Schluss der  $K_{ATP}$ -Kanäle zu erreichen war. In der cell-attached Konfiguration war der Effekt von 100  $\mu\text{M}$  KU14R halbmaximal und mit 300  $\mu\text{M}$  KU14R konnte ein kompletter Kanalschluss erreicht werden. Die von Morgan aufgestellte Hypothese, dass KU14R nur einen partialen Agonisten bezüglich der Wirkung auf  $K_{ATP}$ -Kanäle darstellt, ist daher nicht zutreffend. Vielmehr verhält sich KU14R wie ein voll wirksamer Agonist.

Auf Grund der Tatsache, dass mit KU14R ein kompletter Kanalschluss möglich war, wurde die Wirkung der Substanz auf die Insulinsekretion untersucht. Allgemein gilt die Auffassung, dass ein Schluss des  $K_{ATP}$ -Kanals hinreichend ist, die Insulinsekretion auszulösen. Dieses ist insbesondere dann der Fall, wenn eine Versorgung mit Energiesubstrat vorliegt (HENQUIN, 1998). Das Auslösen der Insulinsekretion durch den Schluss des  $K_{ATP}$ -Kanals wird als „*triggering pathway*“ bezeichnet (HENQUIN, 2000).

Es wurden in der Tat Daten publiziert, die eine eigene insulinsekretionssteigernde Wirkung durch KU14R belegen (BALL et al., 2000; MAYER und TABERNER, 2002). Das Ausmaß der Sekretionssteigerung durch KU14R war in beiden Fällen eine Verdopplung der Sekretionsrate. In vitro wiesen Ball et al. die sekretionssteigernde Wirkung von KU14R in BRIN-BD11-Zellen in Gegenwart von 8,4 mM Glucose nach. BRIN-BD11-Zellen wurden durch Elektrofusion aus RINm5F-Zellen mit Insel-Zellen des Pankreas von New England Deaconess Hospital Ratten erhalten (MC CLENAGHAN et. al., 1996). In vivo zeigten Mayer und Taberner für KU14R bei CBA/Ca-Mäusen eine Steigerung des Plasma-Insulinspiegels bei basalen Glucosespiegeln. Diese Steigerung auf das Doppelte des Ausgangs-Plasma-Insulinspiegels wurde allein für den Messwert 2 Stunden nach Applikation von KU14R

registriert. Anschließend sank der Plasma-Insulinspiegel wieder kontinuierlich auf einen Wert, der den Werten vor KU14R-Zugabe entsprach, ab.

Bei den Messungen zur Beeinflussung des Sekretionsverhaltens durch KU14R in der vorliegenden Arbeit konnte weder mit 30  $\mu\text{M}$  noch mit 100  $\mu\text{M}$  oder 300  $\mu\text{M}$  eine anhaltende Steigerung der Insulinsekretion bei 5 mM oder bei 10 mM Glucose festgestellt werden. Die prästimulatorischen Werte der Sekretion in Gegenwart von 5 mM Glucose sind mit den Werten bei 10 mM Glucose in Gegenwart von KU14R vergleichbar. KU14R ist also praktisch wirkungslos als Verstärker der Insulinsekretion.

Typischerweise schließen Imidazoline den  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal über Bindung an  $K_{\text{ir}}6.2$ . Um dieses zu überprüfen, wurde eine C-terminal trunkierte Variante von  $K_{\text{ir}}6.2$  heterolog in HEK 293 Zellen exprimiert. Im Gegensatz zum Wildtyp wird diese Variante auch ohne die gleichzeitige Expression von SUR1 in die Plasmamembran eingebaut und zeigt dort Kanalaktivität (TUCKER et al., 1997). Dieses ist möglich, da die Deletion am C-Terminalen Ende der Aminosäuren-Sequenz des  $K_{\text{ir}}6.2$  zum Wegfall eines Retentionssignals geführt hat. Dieses Retentionssignal ist im nativen  $K_{\text{ir}}6.2$  dafür verantwortlich, dass dieser nur zusammen mit SUR in die Plasmamembran eingebaut wird (SCHWAPPACH et al., 2000). Dieser  $K_{\text{ir}}6.2\Delta\text{C26}$ -Kanal war durch Phentolamin in den Konzentrationen zu hemmen, in denen Phentolamin auch den natürlichen, aus  $K_{\text{ir}}6.2$  und SUR1 bestehenden  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal hemmt (PROKS und ASHCROFT, 1997; TUCKER et al., 1997). Dieser Befund spricht dafür, dass Phentolamin den Ionenkanal durch direkte Blockade der Ionenpore des  $K_{\text{ATP}}$ -Kanals hemmt. Diese Eigenschaft wurde auch für Cibenzolin (MUKAI et al., 1998a) und Alinidin (GROSSE-LACKMANN et al., 2003) gezeigt.

Für Efaroxan und KU14R ließ sich ein entsprechender Wirkmechanismus vermuten. Es zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass mit 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan und 100  $\mu\text{M}$  KU14R eine ähnlich starke Reduktion der Kanalaktivität des trunkierten  $K_{\text{ir}}6.2\Delta\text{C26}$ -Kanals bewirkt wurde wie an dem nativen  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal der B-Zelle. Beide Ergebnisse wurden in der cell-attached Konfiguration gewonnen, d.h. der Zellstoffwechsel und die Signalkaskade in der B-Zelle sind prinzipiell intakt. Hingegen waren die  $K_{\text{ir}}6.2\Delta\text{C26}$ -Kanäle heterolog in HEK-Zellen exprimiert, in denen B-Zell-typische Signalwege nicht zu erwarten sind. Daher ist die Interpretation naheliegend, dass der primäre Ansatzpunkt für Imidazoline und Imidazole bezogen auf die kanalblockierende Wirkung  $K_{\text{ir}}6.2$  ist und der Kanalschluss vermutlich nicht durch Aktivierung einer Signalkaskade zustande kommt.

Die Anwesenheit von SUR1 scheint die Wirkung der Imidazoline auf  $K_{\text{ir}}6.2$  nicht zu beeinflussen (PROKS und ASHCROFT, 1997). Eine Modulation durch die Anwesenheit von

SUR1 kann bei der hemmenden Wirkung von  $\text{ATP}^{4-}$  auf  $\text{K}_{\text{ir}}6.2$  beobachtet werden. Hier führt die Anwesenheit von SUR1 zu einer ca. siebenfachen Steigerung der kanalschließenden Potenz von  $\text{ATP}^{4-}$  (TUCKER et al., 1997). Ein fehlender Effekt von SUR1 auf die Wirkung von Imidazolinen konnte von Mukai et al. anhand des Cibenzolin-induzierten Schluss des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals 1998 gezeigt werden: an rekonstituierten  $\text{K}_{\text{ir}}6.2/\text{SUR1}$ -Kanälen in COS-7 Zellen waren die  $\text{IC}_{50}$  für Cibenzolin an  $\text{K}_{\text{ir}}6.2\Delta\text{C26}$ -Kanälen in Anwesenheit und in Abwesenheit des SUR1 nicht signifikant verschieden (MUKAI et al., 1998a). Es bleibt zu klären, ob es überhaupt ein Pharmakon gibt, dessen Wirkung an  $\text{K}_{\text{ir}}6.2$  durch SUR1 verstärkt wird.

Es gibt bisher keinen Hinweis darauf, dass Imidazoline zusätzliche Ereignisse, die in der Signalkaskade der Stimulus-Sekretions-Kopplung vor dem Schluss des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals liegen, auslösen (zur weiteren Auseinandersetzung s. Review MORGAN, 1999). Allerdings ist es möglich, dass sie zusätzliche Effekte ausüben, die in der Stimulus-Sekretions-Kopplung nach dem Schluss des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals wirksam werden. Allgemein besteht die Auffassung, dass der Schluss der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle die Depolarisation des Plasmamembranpotentials auslöst. Diese Depolarisation leitet daraufhin die Insulinsekretion ein.

Sollten mögliche zusätzliche Angriffspunkte der Imidazoline in der Stimulus-Sekretions-Kopplung nach einem Schluss der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle in der Aktivierung von Ionenkanälen, die nicht zu den  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanälen gehören, bestehen, wäre eine teilweise Entkopplung zwischen  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalschluss und Membranpotential zu erwarten. Denkbar wäre eine Beeinflussung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (MacDONALD et al., 2002b) oder verschiedener Subtypen der spannungsabhängigen Calciumkanäle (JING et al., 2005; YANG und BERGGREN, 2005). Die durchgeführten Messungen des Membranpotentials zeigten in der whole-cell Konfiguration bei 100  $\mu\text{M}$  KU14R eine stärkere Depolarisation durch die Substanz als Messungen des Membranpotentials in der perforated-patch Konfiguration, die sich an die Bedingungen der intakten Zelle annähert. Mit 300  $\mu\text{M}$  KU14R war auch in der perforated-patch Konfiguration eine deutliche Depolarisation zu erreichen. Dieses spiegelte den kompletten Kanalschluss durch 300  $\mu\text{M}$  KU14R in der cell-attached Konfiguration wieder. Auch die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal-schließende Wirkung des KU14Rs ist in der whole-cell-Konfiguration stärker als in der cell-attached Konfiguration. In der intakten Zelle wie auch in der dialysierten Zelle ist der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal-Schluss durch KU14R also mit einer Depolarisation des Membranpotentials gekoppelt.

Mögliche Ursache dafür, dass KU14R in der dialysierten Zelle der whole-cell Konfiguration eine stärkere Depolarisation und einen stärkeren Kanalschluss als in der intakten Zelle bewirkt, könnte sein, dass KU14R in der cell-attached Konfiguration und in der perforated-

patch Konfiguration stärker im Cytosol oder in der Membran der B-Zelle akkumuliert und den Wirkort an  $K_{ir6.2}$  schlechter erreicht. Weiterhin wäre denkbar, dass in intakten Zellen Effekte von KU14R auf second messenger einen Schluss der  $K_{ATP}$ -Kanäle erschweren. Nach Auswaschen dieser second messenger in der whole-cell Konfiguration könnte eine stärkere Kanalhemmung resultieren.

Im Unterschied zu den Wirkungen des KU14Rs ist die Wirkung des Efaroxans nicht von der Messkonfiguration abhängig. Der Vergleich der  $K_{ATP}$ -Kanal-blockierenden Wirkung durch Efaroxan in der whole-cell Konfiguration und in der cell-attached Konfiguration stützt diesen Befund. Bei Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven für Efaroxan lieferte die whole-cell Konfiguration eine  $EC_{50}$  von 8,8  $\mu M$  (Hill-Koeffizient -1,1) und die cell-attached Konfiguration eine  $EC_{50}$  von 9,9  $\mu M$  (Hill-Koeffizient -0,8).

Angesichts der intakten Kopplung zwischen  $K_{ATP}$ -Kanalschluss und Membranpotential bleibt die Frage, warum KU14R keine Steigerung der Insulinsekretion bewirkte. Auch bei der Wirkung des Efaroxans ist in Gegenwart von 5 mM Glucose eine Diskrepanz zwischen  $K_{ATP}$ -Kanalschluss und Steigerung der Insulinsekretion zu beobachten. Unter diesen Bedingungen steigerte Efaroxan die Insulinsekretion nicht, obwohl der Kanal geschlossen und nachweislich das cytosolische Calcium erhöht war (BLECK et al., 2004). Erst bei Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM wurde die Insulinsekretion durch Efaroxan gesteigert. Neben dem  $K_{ATP}$ -Kanal gibt es daher für Imidazoline wahrscheinlich weitere mögliche Angriffspunkte in der Signalkette, die zur Insulinsekretion führt.

Ein weiterer möglicher Angriffspunkt könnte im Bereich von Mechanismen, die nach einem Anstieg der cytosolischen Calcium-Konzentration wirksam werden, lokalisiert sein. Als Funktion dieses Angriffspunktes für Imidazoline wäre die Regulation der Umsetzung eines Anstiegs der cytosolischen Calcium-Konzentration in eine Steigerung der Insulinsekretion denkbar. Zur Zeit lässt sich vermuten, dass die Bindung des Imidazolins Efaroxan an diese Struktur die Umsetzung eines Anstiegs des Calciums in eine gesteigerte Sekretion hemmt. Eine Erhöhung der Glucosekonzentration würde diese hypothetische Hemmung vermindern und in eine Steigerung überführen.

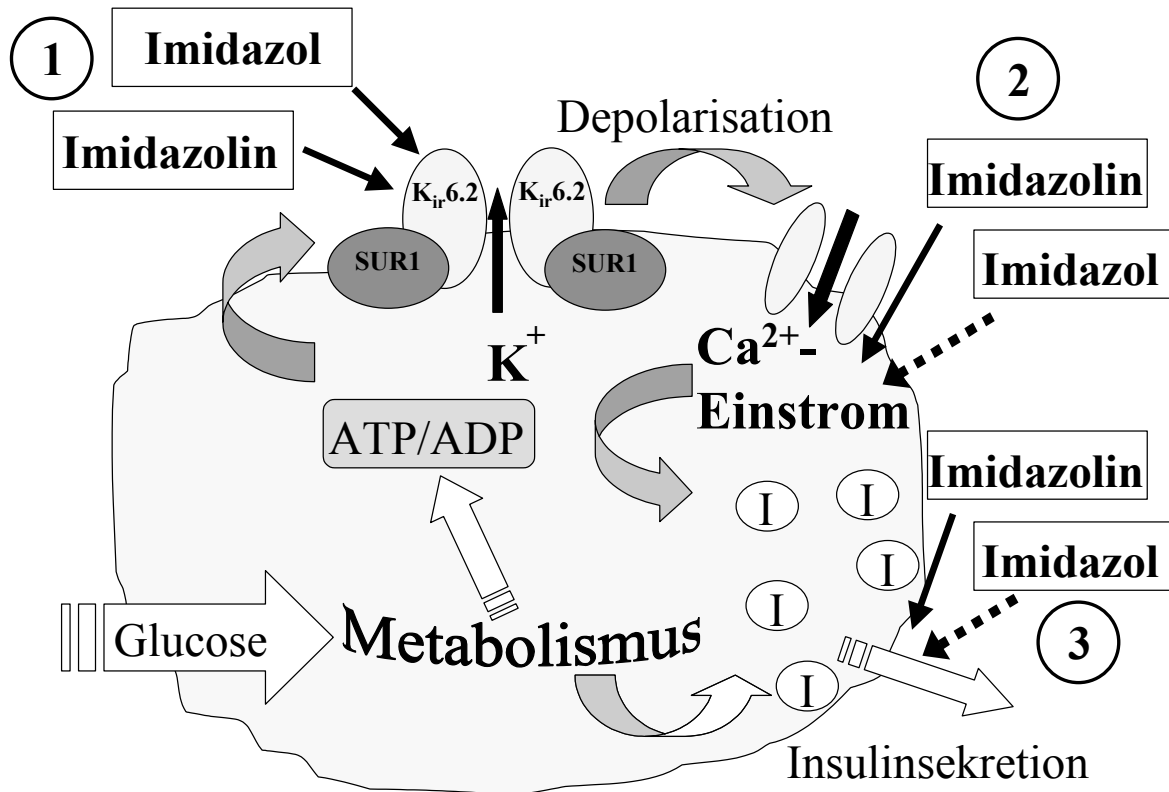
Für KU14R ist es schwierig zu sagen, ob die Substanz Effekte nach einem Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration besitzt, da KU14R eine deutlich geringere Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration bewirkte als Efaroxan (BLECK et al., 2005). Die durch 10 mM Glucose hervorgerufene Steigerung des cytosolischen Calciums war jedoch durch KU14R nicht vermindert. Das heißt, es gibt wahrscheinlich noch einen weiteren Angriffspunkt, an dem KU14R eine Umsetzung der Depolarisation in Erhöhung der

Calciumkonzentration verhindert. Hierbei scheint es sich nicht um eine unspezifische Hemmung von spannungsabhängigen Calciumkanälen zu handeln. Diese kann daraus gefolgert werden, dass die gleichzeitige Anwesenheit von KU14R den durch Efaroxan und den durch eine Erhöhung der Glucosekonzentration bewirkten Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration unbeeinflusst lässt (BLECK et al., 2005).

Einige Imidazoline wie Clonidin können auch als  $\alpha_2$ -Agonisten wirksam werden. Die Aktivierung von  $\alpha_2$ -Rezeptoren an der B-Zelle würde zu einer Hemmung der Insulinsekretion führen (SAMOLS und WEIR, 1979; ROBERTSON und PORTE, 1973). In der Literatur wird für Efaroxan und KU14R ein  $\alpha_2$ -Antagonismus beschrieben (CHAN und MORGAN, 1990; CHAN et al., 1998b). Aber die Eigenschaft des  $\alpha_2$ -Antagonismus ist nicht für Insulinsekretionssteigerung durch die Substanzen entscheidend, sondern die Imidazolinstruktur wie Schulz und Hasselblatt zeigten (SCHULZ und HASSELBLATT, 1989a). Für einen möglichen therapeutischen Einsatz sollte diese  $\alpha_2$ -antagonistische Eigenschaft aber bedacht werden, da Einflüsse auf das kardiovaskuläre System hierüber möglich sein könnten (SLOUGH et al., 2002). Ein Ziel sollte sein, Derivate ohne Affinität zu  $\alpha_2$ -Rezeptoren mit glucoseselektiver Steigerung der Insulinsekretion zu entwickeln.

Aus den ermittelten Ergebnissen kann gefolgert werden, dass  $K_{ir}6.2$  einen Angriffspunkt von Imidazolinen und Imidazolen bildet und in beiden Fällen die Depolarisation der Plasmamembran der B-Zelle bewirkt (s. Abbildung 5.1). Eine weitere Wirkung von Efaroxan bei basalen Glucosewerten besteht in einer Hemmung der Insulinsekretion, die man durch eine Depolarisation erwarten würde. Durch eine Steigerung des Glucosestoffwechsels kann diese Hemmung in eine Steigerung der Insulinsekretion umgekehrt werden. Die Wirkungen von KU14R bestehen nach einer Depolarisation durch Angriff an  $K_{ir}6.2$ , in einer Hemmung der Insulinsekretion, die nicht in eine Steigerung umgekehrt werden kann und im Unterschied zu Efaroxan verhindert KU14R einen Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration, der auf eine Depolarisation des Membranpotentials folgen sollte.





**Abbildung 5.1:** Übersicht über die möglichen Angriffspunkte von Imidazolin und Imidazol an der B-Zelle des Pankreas. 1 kennzeichnet den gemeinsamen Angriffspunkt von Imidazolin und Imidazol an K<sub>ir</sub>6.2, über den beide einen Schluss des K<sub>ATP</sub>-Kanals bewirken. 2 kennzeichnet die Beeinflussung der cytosolischen Calciumkonzentration. Imidazoline erhöhen diese, wohingegen Imidazole wie KU14R die Umsetzung der Depolarisation in einen Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration durch noch nicht geklärte Mechanismen zu verhindern scheinen. Mit 3 sind Angriffspunkte im Bereich der Exocytose gekennzeichnet, bei denen Imidazoline eine Steigerung bewirken können, wenn die Glucosekonzentration erhöht ist. Imidazole hingegen scheinen praktische keine steigernde Wirkung in diesem Bereich zu besitzen.

### **5.3 Konsequenzen der Hemmung des Energiestoffwechsels der B-Zellen für den Imidazolin-induzierten Schluss von $K_{ATP}$ -Kanälen**

Mit dem Nachweis, dass die Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität durch Imidazoline durch einen Ansatz an der porenbildenden Untereinheit  $K_{ir}6.2$  bewirkt wird, stellte sich die Frage, ob ein solcher Effekt mit der angestrebten Organselektivität eines Antidiabetikums vereinbar ist. Nun ist zwar eine über den Sulfonylharnstoffrezeptor SUR1 vermittelte Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals auch nicht B-zellspezifisch, da nicht nur B-Zellen des Pankreas, sondern auch neuronale Zellen einen aus  $K_{ir}6.2$  und SUR1 bestehenden  $K_{ATP}$ -Kanal besitzen. Kritisch ist jedoch vor allem eine Wirkung an kardialen, aus  $K_{ir}6.2$  und SUR2A bestehenden Kanälen (BABENKO et al., 1998), die das Risiko kardiovaskulärer unerwünschter Wirkungen zur Folge haben könnten. Auch die Möglichkeit, dass  $K_{ATP}$ -Kanäle außerhalb der B-Zelle physiologischerweise geöffnet sind, lässt die Beantwortung der Frage dringlich erscheinen, ob ein über  $K_{ir}6.2$  vermittelter Schluss eines  $K_{ATP}$ -Kanals durch pharmakologische oder physiologische Regulatoren beeinflusst werden kann.

Die bisherige Datenlage dazu war widersprüchlich. Von der Arbeitsgruppe um Henquin war gefunden worden, dass nur eine sehr geringe Öffnung des durch Phentolamin oder Clonidine blockierten  $K_{ATP}$ -Kanals durch Diazoxid erreicht werden kann (PLANT und HENQUIN, 1990, PLANT et al., 1991), während von der Gruppe um Dunne eine nahezu vollständige Antagonisierbarkeit selbst sehr hoher Phentolamin-Konzentrationen durch Diazoxid berichtet wurde (SHEPERD et al., 1996). Darüber hinaus gab es Berichte über unterschiedliche Auswirkungen einer Hemmung des Energiestoffwechsels auf den Sulfonylharnstoff-induzierten Schluss des  $K_{ATP}$ -Kanals einerseits und auf den Imidazolin-induzierten Schluss dieses Kanals andererseits. Während der Sulfonylharnstoff-induzierte Block in Gegenwart von Hemmstoffen des Energiestoffwechsels an Effektivität abnahm, war der Imidazolin-induzierte Block nicht zu beeinflussen (MUKAI et al., 1998b). Eine solche vom Energiestoffwechsel unabhängige Effektivität wie sie auch für das Phenylalaninderivat Nateglinid (A4311) beschrieben wurde, wurde zunächst als therapeutisch vorteilhaft bewertet (FUJITANI et al., 1997). Angesichts der möglichen cytoprotektiven Bedeutung des Öffnens der  $K_{ATP}$ -Kanäle in Stress-Situationen ist eine erhaltene metabolische Regulierbarkeit jedoch als prinzipiell vorteilhaft zu werten.

Es wurde die gleiche Auswahl von insulinsekretionssteigernden Imidazolinen, die auch hinsichtlich ihrer desensitisierenden und B-zelltoxische Wirkung charakterisiert worden waren (RUSTENBECK et al 2001a, 2001b, 2004b), daraufhin geprüft, ob der durch sie verursachte Block des  $K_{ATP}$ -Kanals und seine funktionellen Konsequenzen (Depolarisation, Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration, Insulinsekretion) durch den

Kaliumkanalöffner Diazoxid oder durch das Nukleosiddiphosphat MgGDP bzw. durch Hemmung des Energiestoffwechsels antagonisiert werden können. In inside-out patches aus normalen B-Zellen wurde die Wirkung von MgGDP auf den durch Imidazoline bewirkten Kanalschluss getestet und mit der Wirkung auf den durch Tolbutamid und Chinin bewirkten Kanalschluss verglichen. Der Sulfonylharnstoff Tolbutamid wurde als Vergleichssubstanz gewählt, weil der Effekt im mikromolaren Konzentrationsbereich über SUR1 vermittelt wird (ASHCROFT und GRIBBLE, 1999) und Chinin, weil der Kanalschluss ebenso wie bei den Imidazolininen über  $K_{ir}6.2$  vermittelt ist (GRIBBLE et al., 2000; GROSSE-LACKMANN et al., 2003). Es zeigte sich, dass MgGDP die Wirkung aller Testsubstanzen signifikant vermindern konnte, dabei erhöhte sich die Kanalaktivität im Durchschnitt auf das 4fache. Allerdings führte die zusätzliche Anwesenheit von Diazoxid nur bei Tolbutamid und Alinidin, nicht aber bei Phentolamin und Chinin zu einer weiteren Zunahme der Kanalaktivität (GROSSE-LACKMANN und RUSTENBECK, unveröffentlichte Beobachtung). Es war nun die Frage zu beantworten, ob Diazoxid nur bei einigen Imidazolininen antagonistisch wirkt oder ob die fehlende Steigerung dadurchbedingt war dass MgGDP bereits eine maximale Kanalaktivität bewirkt hatte.

Wurde der Antagonismus zwischen Diazoxid und den Imidazolininen in einem weniger reduktionistischen Modell getestet, der Messung des Plasmamembranpotentials in der konventionellen whole-cell Konfiguration der Patch-Clamp Technik, so zeigte sich, dass prinzipiell alle getesteten Imidazoline in ihrer depolarisierenden Wirkung durch Diazoxid vollständig zu antagonisieren waren. Unterschiedlich fiel jedoch das Ergebnis aus, wenn die cytosolischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) als indirekter Parameter der Wirkung in einzelnen intakten B-Zellen zugrunde gelegt wurde. Hier waren zwar die von Alinidin, Idazoxan und Efaroxan hervorgerufenen Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Diazoxid ebenso zu antagonisieren wie der durch Tolbutamid hervorgerufene Anstieg, nicht aber die von Phentolamin oder Chinin bewirkten Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$ .

Die Ergebnisse der Sekretionsmessungen mit perifundierten Inseln entsprachen den mit der Messung der cytosolischen Calciumkonzentration erhaltenen Ergebnissen. Der Unterschied zwischen den Ergebnissen der Membranpotentialmessungen einerseits und den Ergebnisse der  $[Ca^{2+}]_i$  - und Sekretionsmessungen andererseits ist am ehesten durch die unterschiedliche zelluläre Integrität zu erklären. In intakten Zellen könnte die intrazelluläre Akkumulation dieser letzteren beiden Substanzen für den mangelnden Antagonismus verantwortlich sein. Bereits in früheren Versuchen zur Desensitisierung wiesen die Ergebnisse auf eine anhaltende

intrazelluläre Akkumulation von Phentolamin und Chinin hin (RUSTENBECK et al., 2001a und b).

In dieser Arbeit sollte nun die Auswirkung der metabolischen Blockade mit NaCN auf die an SUR1 oder  $K_{ir6.2}$  bewirkte Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanalfunktion durch Patch-Clamp Messungen an intakten B-Zellen in der cell-attached Konfiguration gemessen werden. Dabei wurde von der Annahme ausgegangen, dass NaCN zu einer Abnahme der ATP- und einem Anstieg der ADP-Konzentration führt, so dass letztlich die Verhältnisse denjenigen entsprechen müssten, die nach der Gabe von GDP im inside-out patch zu beobachten waren.

In Gegenwart von 5 mM Glucose reduzierten 250  $\mu$ M NaCN den ATP-Gehalt inkubierter Inseln von  $3,3 \pm 0,3$  pmol/Insel auf  $0,9 \pm 0,2$  pmol/Insel (SOLTAN-MOHAMMADI und RUSTENBECK, unveröffentlichte Beobachtung). Im Gegensatz zu Diazoxid war NaCN (250  $\mu$ M) nicht in der Lage, die Wirkung von 100  $\mu$ M Alinidin signifikant zu vermindern, obwohl die Wirkung von Alinidin durch MgGDP im inside-out Patch antagonisierbar gewesen war. Wurde Alinidin in dieser Arbeit nun in 10fach niedriger Konzentration (10  $\mu$ M, wie in den inside-out Versuchen) eingesetzt, so war ein signifikanter öffnender Effekt durch die metabolischen Hemmung zu verzeichnen. Auch die Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals durch 10  $\mu$ M Phentolamin war durch Blockade des Energiestoffwechsel zu vermindern. Besonders interessant war das mit Efaroxan erzielte Ergebnis: Nicht nur bei 10  $\mu$ M, sondern auch in der nahezu maximal effektiven Konzentration von 100  $\mu$ M war der Effekt von Efaroxan durch NaCN praktisch aufzuheben. Bei den Ergebnissen (s. 4.3.1) fiel auf, dass sich die Wirkung von 100  $\mu$ M Efaroxan anscheinend besser durch NaCN antagonisieren ließ als die Wirkung von 10  $\mu$ M Efaroxan. Dieses ist erstaunlich, wenn ein konzentrationsabhängiger Antagonismus zwischen dem Imidazolin und NaCN angenommen wird.

Allerdings wurden die Werte auf die Kanalaktivität der Zelle vor Applikation der Testsubstanz normalisiert. Hier wurden nur die Kanäle erfasst, die spontan aktiv sind. Der Experimentator kann keine Aussagen über die tatsächlich im Patch vorhandene Anzahl an Kanälen treffen. Durch die Zugabe von NaCN und der damit verbundenen Produktion von ADP könnten alle im Patch vorhandenen Kanäle geöffnet werden. Daher wurden die Ergebnisse noch einmal auf die Bedingungen unter NaCN alleine normalisiert. Hierbei zeigte sich, dass die Reduktion der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität durch 10  $\mu$ M Efaroxan auf 19,1 % durch die gleichzeitige Anwesenheit von 250  $\mu$ M NaCN auf 31,1 % angehoben wurde. Bei 100  $\mu$ M Efaroxan ergab sich eine Reduktion der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität auf 2,1 %, die durch die gleichzeitige Anwesenheit von 250  $\mu$ M NaCN nur auf 9,5 % angehoben wurde. Diese Daten

stützen die Annahme eines konzentrationsabhängigen Antagonismus zwischen Efaroxan und NaCN.

Auch der Effekt von Phentolamin ist antagonisierbar. Allerdings zeigte sich hier die träge Kinetik des Imidazolins. Bei der alleinigen Zugabe von Natriumcyanid ist noch der Effekt des Phentolamins wirksam, welches an den nahezu identischen Werten der Kanalaktivität unter Einfluss von Phentolamin mit 250  $\mu\text{M}$  NaCN und 250  $\mu\text{M}$  NaCN alleine erkennbar ist.

Insgesamt lassen sich hieraus zwei Schlussfolgerungen ableiten:

- 1) Die Funktion des  $K_{\text{ATP}}$ -Kanals, bei Energiesubstratmangel eine Hyperpolarisation und zelluläre Ruhigstellung zu bewirken, ist in Gegenwart von Imidazolinen mit schneller Wirkungskinetik wie Efaroxan nicht stärker beeinträchtigt als in Gegenwart von Sulfonylharnstoffen.
- 2) Die über  $K_{\text{ir}}6.2$  bewirkte Hemmung der Kanalaktivität kann durch Liganden am Sulfonylharnstoffrezeptor SUR1 (wie Diazoxid oder MgADP) moduliert werden. Da die SUR-Untereinheit des  $K_{\text{ATP}}$ -Kanals die Gewebsspezifität dieses Ionenkanals ausmacht, könnte auch eine gewebspezifische Modulation des hemmenden Effekts der Imidazoline durch endogene und pharmakologische Liganden an SUR möglich sein.

#### **5.4 Messungen des Membranpotentials an B-Zellen im Zellverband der Langerhans'schen Insel und die Wirkung von Efaroxan**

Die elektrophysiologischen Eigenschaften insulinproduzierender Zellen wurden bisher an Einzelzellen untersucht. Messungen der Insulinsekretion hingegen erfolgen jedoch größtenteils an isolierten Langerhans'schen Inseln. Diese setzen sich neben B-Zellen aus A-, D- und PP-Zellen zusammen. Interaktionen zwischen B-Zellen untereinander und zwischen B-Zellen und Nicht-B-Zellen können bei elektrophysiologischen Untersuchungen an Einzelzellen nicht erkannt werden. Bei den Wirkungen von Efaroxan war in Gegenwart von 5 mM Glucose eine deutliche Depolarisation des Membranpotentials isolierter Einzelzellen zu beobachten. Diese war aber nicht mit einer Steigerung der Insulinsekretion isolierter Langerhans'scher Inseln verbunden. Für einige Imidazoline wurde beschrieben, dass sie Wirkungen auf A-Zellen ausüben und die Glucagonsekretion hemmen (MOURTADA et al., 1997; EFANOVA et al., 1998; HØY et al., 2003). Inwiefern dadurch die elektrophysiologische Reizbeantwortung der B-Zelle auf Imidazoline in der intakten Insel beeinflusst wird, könnte durch Etablierung der Patch-Clamp-Technik an dem komplexeren System der intakten Insel geklärt werden.

Es ist bekannt, dass es innerhalb der Langerhans'schen Insel Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Zelltypen gibt und dass diese Interaktionen auch die Sekretionsrate beeinflussen (PIPELEERS et al, 1982; MEDA et al., 1990; QUESADA et al., 2003). Die Kopplung zwischen A- und B-Zellen erfolgt wahrscheinlich über parakrine Mechanismen (HOLZ und HABENER, 1992; NADAL et al., 1999), wohingegen für die elektrische Kopplung der B-Zellen untereinander Connexine verantwortlich gemacht werden (MEARS et al., 1995; ATWATER et al., 1996; ANDREU et al., 1997; QUESADA et al., 2003). Connexine sind Bestandteile der Gap-Junctions, die in Maus B-Zellen vorwiegend durch einen Connexin-Subtyp mit einem Molekulargewicht von 36 kDalton (Cx36) gebildet werden (SERRE-BEINIER et al., 2000).

Die elektrischen Eigenschaften isolierter B-Zellen scheinen sich auf Grund der oben beschriebenen Interaktionen zwischen den Zellen von den elektrischen Eigenschaften der B-Zellen innerhalb des Zellverbands der Insel zu unterscheiden (ATWATER et al., 1996, SPEIER et al, 2005). Zum Beispiel sollen nur B-Zellen innerhalb der Langerhans'schen Insel oder in Clustern von mindestens 4 Zellen bei Erhöhung der Glucosekonzentration von 0 mM auf z.B. 11 mM den typischen Wechsel zwischen „*bursts*“ und „*silent intervalls*“ im Membranpotentials zeigen. Oszillationen in einzelnen B-Zellen werden nur selten beobachtet (SMITH et al., 1990; ATWATER et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit sind Oszillationen

des Membranpotentials an Einzelzellen beschrieben. Diese wurden aber nur in Gegenwart eines Imidazolins beobachtet. Eine alleinige Erhöhung der Glucosekonzentration führte auch bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen nicht zu Oszillationen des Membranpotentials von Einzelzellen.

1999 wurde von der Arbeitsgruppe um Rorsman die ersten Patch-Clamp-Experimente an isolierten Inseln veröffentlicht (GÖPEL et al., 1999). Hierbei zeigten sie, dass der maximale Calcium-Einstrom in B-Zellen der intakten Insel fast doppelt so hoch ist wie in der isolierten B-Zelle. Die gleiche Arbeitsgruppe beschrieb kürzlich auch, dass sich Änderungen der Membrankapazität, die als Maß für die Exocytose herangezogen werden, in isolierten B-Zellen und B-Zellen im Inselverband deutlich voneinander unterscheiden. Bei B-Zellen im Inselverband betrug der durch Depolarisation ausgelöste Kapazitätsanstieg weniger als 5 % des Kapazitätsanstiegs isolierter B-Zellen. Darüber hinaus vollzog sich die Kapazitätsänderung der B-Zelle in der intakten Insel langsamer als die der isolierten B-Zelle (GÖPEL et al., 2004).

Diese Ergebnisse zeigen, dass einige elektrophysiologische Eigenschaften der B-Zelle deutlich verändert sind, wenn diese aus dem Zellverband der Insel herausgelöst wird. Mögliche Ursachen hierfür könnten einerseits die Isolierung der Insel durch das Enzym Kollagenase, die verschiedenen Methoden zur Auflösung des Inselverbandes oder durch die Zellkulturphase, die für Messungen an Einzelzellen unumgänglich ist, bedingt sein. Andererseits könnten die Unterschiede aber auch Ausdruck der physiologischen Regulation innerhalb der intakten Insel sein.

Die methodisch eleganteste Lösung, intakte Inseln für Patch-Clamp-Versuche zu gewinnen, wurde von Speier und Rupnik entwickelt (SPEIER und RUPNIK, 2003, SPEIER, 2004). Ihre Technik erlaubt es, Gewebeschnitte des Gesamtpankreas anzufertigen. Diese Gewebeschnitte können anschließend für bis zu 6 Stunden für elektrophysiologische Untersuchungen genutzt werden. Speier und Rupnik umgehen mit ihrer Technik die Beeinflussung der elektrophysiologischen Eigenschaften durch Kollagenaseisolierung und Zellkultur. Der von der Arbeitsgruppe um Rorsman gewählte methodische Ansatz an Inseln, die mit Hilfe einer Saugpipette im Bad festgehalten werden, zu arbeiten, bedarf hingegen Kollagenaseisolierung der Pankreasinseln und eine Zellkulturphase von bis zu 24 Stunden (GÖPEL et al., 1999).

Bei elektrophysiologischen Untersuchungen an intakten Inseln muss beachtet werden, dass die Langerhans'schen Inseln von Mäusen nur zu 80 % aus Insulin produzierenden B-Zellen bestehen (GEPTS et al., 1960). Des weiteren setzt sich die Insel aus Glukagon sezernierenden A-Zellen, Somatostatin sezernierenden D-Zellen und PP-Zellen, die das pankreatische

Polypeptid bilden, zusammen. Bei der Auswahl der Zellen für die Sealherstellung mit der Patch-Pipette in der intakten Insel gibt es keine eindeutigen optischen Kriterien, an denen B-Zellen erkennbar wären. Daher können neben B-Zellen also auch die anderen Zelltypen getroffen werden.

Für Patch-Clamp Experimente an isolierten Einzelzellen wurden auf der Grundlage von Barg et al. 2000 mehrere Kriterien entwickelt, die zur Identifizierung von B-Zellen herangezogen werden. Die Untersuchungen von Barg et al. zeigten, dass in Einzelzell-Präparationen aus dem Pankreas von NMRI-Mäusen der Anteil von D- und PP-Zellen nur 2 % beziehungsweise 5 % betrug. Die Einzelzell-Präparationen wurden auf die gleiche Weise wie in der vorliegenden Arbeit angefertigt. Zur Unterscheidung zwischen B- und A-Zellen wurde zum einen die Größe herangezogen. Für A-Zellen wird ein Durchmesser von 10  $\mu\text{M}$  und für B-Zellen ein Durchmesser von 15  $\mu\text{M}$  angegeben (BARG, 2003). Dieses korrespondiert mit einer Zellkapazität von 3 pF für A-Zellen und 6-7 pF für B-Zellen (BARG et al., 2000). Die Zellkapazität kann als Maß für die Größe einer Zelle herangezogen werden, bei der 10 fF/ $\mu\text{m}^2$  als Umrechnungsfaktor dienen.

Außerdem weisen A-Zellen eine deutlich geringere Dichte von  $K_{\text{ATP}}$ -Kanälen auf (BARG et al., 2000; GÖPEL et al., 2000) und zeigen bei Messungen des Membranpotentials elektrische Aktivität bei niedrigen Glucose-Konzentrationen, wohingegen bei B-Zellen die elektrische Aktivität erst durch erhöhte Glucose-Konzentrationen ausgelöst wird (BARG et al., 2000; GÖPEL et al., 2000). Für die Messungen an einzelnen B-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit für die cell-attached Messungen hauptsächlich Zellen mit einem Durchmesser über 10  $\mu\text{M}$  verwendet, bei denen im Patch mehr als ein  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal aktiv war. Dieses letzte Kriterium sollte bei B-Zellen auf Grund der höheren  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal-Dichte eher erfüllt sein. Dieses Kriterium wurde auch für die Versuche in der whole-cell-Konfiguration an einzelnen B-Zellen angewendet. Hierbei kam als zusätzlicher Kontrollparameter hinzu, dass der Wert der Membrankapazität bei  $10,2 \pm 0,7$  pF ( $n = 20$ ) lag, welches den Angaben für B-Zellen von Barg et al. 2000 entsprach.

Innerhalb der intakten Insel kann die Auswahl der Zellen nicht mehr nach der Größe getroffen werden, da diese nur für isolierte Zellen gut bestimmt werden kann. Die Kapazität der untersuchten Zellen im Gewebeschnitt innerhalb der intakten Insel lag bei  $6,9 \text{ pF} \pm 0,8$  ( $n = 3$ ) und stimmte mit den von Göpel et al. 1999 publizierten Kapazitätswerten von 7,4 pF für B-Zellen im Inselverband gut überein. Im Einzelfall kann es aber trotzdem zu Überschneidungen mit A-Zellen innerhalb der Inseln kommen, da es sich bei den genannten Kapazitätswerten um Mittelwerte handelt. Daher wurde zur weiteren Unterscheidung der beiden Zelltypen ein



von Speier (SPEIER, 2004) entwickeltes Voltage-Clamp Stimulationsprotokoll eingesetzt (s. Abbildung 4.28).

Dieses orientiert sich an der von Göpel et al. 1999 beschriebenen Eigenschaft, dass B-Zellen unter besonderen Bedingungen einen inaktivierbaren Natriumstrom aufweisen. Dieser Natriumstrom ist nur zu beobachten, wenn die Zellen eine Phase der Hyperpolarisation durchlaufen, bevor sie depolarisiert werden. Auch dann ist der Natriumstrom nur wenige Millisekunden (unter 5 ms) zu beobachten (GÖPEL et al., 1999, s. Abbildung 4.28). Die Existenz von Natriumströmen an B-Zellen war lange Zeit umstritten (DUNNE et al., 1994).

Eine konkrete Anwendung der Technik, Patch-Clamp-Untersuchungen an Pankreas-Schnitten durchzuführen („slice-Technik“), ergab sich im Rahmen dieser Arbeit durch den Befund, dass 100  $\mu$ M Efaroxan einerseits  $K_{ATP}$ -Kanäle weitgehend schließen und eine starke Depolarisation der Plasmamembran herbeiführen, andererseits in Gegenwart von 5 mM Glucose keine Steigerung der Insulinsekretion bewirken. Da hier elektrophysiologische Daten von Einzelzellen mit Sekretionsuntersuchungen an intakten Inseln verglichen wurden, könnte diese Diskrepanz durch das unterschiedliche experimentelle Modell bedingt sein. Es war möglich zu zeigen, dass Efaroxan auch im Zellverband der Insel zu einer ausgeprägten Depolarisation der B-Zelle führte. Diese war zwar geringer ausgeprägt als die unter gleichen Bedingungen gemessene Depolarisation an der kultivierten Einzelzelle, aber dennoch mit einem zu beobachtenden Anstieg der cytosolischen Calcium-Konzentration innerhalb der isolierten Insel gekoppelt (BLECK et al., 2004). Daher ist die Ursache für die Diskrepanz zwischen  $K_{ATP}$ -Kanal Blockade und fehlender Sekretionssteigerung am ehesten distal des Anstiegs der cytosolischen Calcium-Konzentration lokalisiert.

Die Möglichkeit, elektrophysiologische Eigenschaften von B-Zellen an den durch Agarose stabilisierten Schnitten des Gesamtpankreas zu messen, hat zudem den Vorteil, dass die im Schnitt vorliegenden Inseln frisch isoliert sind. Damit entfällt die für Einzelzelluntersuchungen unumgängliche Zellkulturphase. Diese Zellkulturphase wirkt wahrscheinlich verzerrend auf die Glucoseabhängigkeit des insulinotropen Effekts des Efaroxans. Es kommt nämlich bei Sekretionsmessungen an Inseln, die eine 18 stündige Zellkulturphase (RPMI 1640 mit 5 mM Glucose) durchlaufen haben, durch 100  $\mu$ M Efaroxan schon in Gegenwart von 5 mM Glucose zu einer mäßigen Steigerung der Insulinsekretion. Frisch isolierte Inseln hingegen reagierten unter den gleichen Bedingungen nicht mit einer Steigerung der Insulinsekretion (RUSTENBECK et al., 2004a).

Angesichts der Befunde aus der Gruppe um Rorsman, dass sich die Kapazitätsänderungen in isolierten B-Zellen und B-Zellen im Inselverband ganz wesentlich voneinander unterscheiden

(GÖPEL et al., 2004) erscheint es lohnenswert, die Patch-Clamp Technik an Pankreasschnitten weiter zu entwickeln und zusätzlich Kapazitätsmessungen zu etablieren.

Die Forderung, elektrophysiologische Parameter möglichst unter den gleichen Bedingungen wie die Insulinsekretion zu messen ist nicht nur von theoretischem Interesse. Vielmehr geht es um die konkrete Zuordnung der Wirkungen des Efaroxans, beziehungsweise letztendlich jedes insulintrop wirkenden Pharmakons, zu Zielstrukturen im „*triggering pathway*“ oder „*amplifying pathway*“ der Insulinsekretion (HENQUIN, 2000). Damit Fehlinterpretationen vermieden werden, sollten die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen und der Sekretionsstudien unter möglichst identischen Bedingungen gewonnen werden. Um diese Bedingung zu erfüllen, lohnt es sich, den sehr viel höheren methodische Aufwand, der mit den elektrophysiologischen Untersuchungen an Schnitten gegenüber Untersuchungen an Einzelzellen verbunden ist, zu erbringen.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkmechanismen, mit denen Imidazoline der ersten Generation die Insulinsekretion steigern. Von einigen Imidazolinen wie RX871024 und Efaroxan wurde gezeigt, dass sie ihre insulinsekretionssteigernde Wirkung nur bei Glucosekonzentrationen ausüben, die für sich alleine genommen bereits die Insulinsekretion steigern (Glucoseselektivität). Diese therapeutisch interessante Eigenschaft verliert RX871024 jedoch in höheren Konzentrationsbereichen. Bisher wurde dieses Phänomen mit einer bei höheren Konzentrationen zunehmenden Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals der B-Zelle durch die Substanz erklärt, wodurch auch bei basalen Glucosekonzentrationen eine Sekretionssteigerung ausgelöst werden kann. Im engeren Sinne befasst sich diese Arbeit mit dem Problem, in welchem Verhältnis die von den Imidazolinen ausgeübte Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals der B-Zelle zur Glucoseselektivität der insulinsekretionssteigernden Wirkung steht.

Insbesondere sollten die Fragen beantwortet werden, ob die Testsubstanzen den  $K_{ATP}$ -Kanal tatsächlich erst dann in einem relevanten Ausmaß hemmen, wenn die Sekretionssteigerung nicht mehr glucoseselektiv ist, ob sich die Imidazolsubstanz KU14R tatsächlich als Antagonist von insulinsekretionssteigernden Imidazolinen verhält, indem sie die durch Imidazoline geschlossenen  $K_{ATP}$ -Kanäle wieder öffnet, und ob die von Imidazolin ausgeübte hemmende Wirkung auf den  $K_{ATP}$ -Kanal durch den Energiestoffwechsel der B-Zelle moduliert werden kann.

Dazu wurden Messungen der Insulinsekretion an umströmten Pankreasinseln von NMRI Mäusen und elektrophysiologische Messungen an einzelnen Inselzellen in verschiedenen Konfigurationen der Patch-Clamp Technik durchgeführt.

Dabei konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

1) Der Vergleich der Glucoseabhängigkeit der Wirkungen von Efaroxan und RX871024, zwei gegenüber Imidazolin der ersten Generation neueren Imidazolin, und von Phentolamin, dem prototypischen insulinsekretionssteigernden Imidazolin, ergab, dass die Auffassung, Imidazoline besäßen ein einheitliches Wirkprofil nicht zutrifft. Bei ähnlich ausgeprägter Depolarisation steigerte Phentolamin (100  $\mu$ M) die Insulinsekretion bereits bei 5 mM Glucose, wohingegen Efaroxan (100  $\mu$ M) erst mit Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM einen insulinsekretionssteigernden Effekt ausübte. Obwohl das Ausmaß der Depolarisation durch die untersuchten Imidazoline identisch war, wurden qualitative Unterschiede beobachtet. Bei den durch Efaroxan ausgelösten Depolarisationen kam es in 50 % der Versuche zu spontanen Repolarisationen, so dass ein Wechsel zwischen depolarisierten

und repolarisierten Phasen beobachtet wurde. Dieses kann unter dem Begriff „Oszillationen“ des Membranpotentials zusammengefasst werden. Bei den durch RX871024 ausgelösten Depolarisationen waren diese Oszillationen seltener zu beobachten und bei den Depolarisationen durch Phentolamin kam es in keinem Versuchsverlauf zu Oszillationen des Membranpotentials. Auch zwischen den glucoseselektiven Imidazolin Efaroxan und RX871024 zeigten sich weitere Unterschiede. Wurden Konzentrationen verwendet, die jenseits der maximal effektiven Konzentration am  $K_{ATP}$ -Kanal lagen (500  $\mu$ M Efaroxan bzw. 100  $\mu$ M RX871024) so steigerten beide Substanzen die Sekretion bereits in Gegenwart von 5 mM Glucose. Der von RX871024 verursachte Anstieg führte jedoch nicht zu einer anhaltenden Sekretionssteigerung, sondern ging nach einem Spitzenwert in eine kontinuierliche Abnahme über, die auch durch Erhöhung der Glucosekonzentration nur temporär unterbrochen wurde. Efaroxan hingegen steigerte die Sekretion anhaltend und die Erhöhung der Glucosekonzentration bewirkte eine weitere plateauartig anhaltende Steigerung der Sekretion.

2) Der vermeintliche Imidazolinantagonist KU14R (das Imidazol-Analogon des insulinsekretionssteigernden Imidazolins Efaroxan) antagonisierte in einer äquimolaren Konzentration die von Efaroxan stimulierte Insulinsekretion nicht, öffnete nicht die von Efaroxan geschlossenen  $K_{ATP}$ -Kanäle und hob auch nicht die dadurch ausgelöste Depolarisation der B-Zelle auf. Hingegen zeigte sich, dass KU14R selbst eine hemmende Wirkung auf  $K_{ATP}$ -Kanäle der B-Zelle hatte ( $IC_{50}$  31,9  $\mu$ M, Hill  $-1,5$ ), die ebenso wie die hemmende Wirkung von Efaroxan ( $IC_{50}$  8,8  $\mu$ M, Hill  $-1,1$ ) zur vollständigen Blockade der  $K_{ATP}$ -Kanäle führte. Ebenso wie Efaroxan reduzierte KU14R die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität durch Angriff an der porenbildenden Untereinheit  $K_{ir}6.2$ . Überraschenderweise bewirkte aber die Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals durch KU14R keine Stimulation der Insulinsekretion, obwohl eine starke Depolarisation der Plasmamembran beobachtet werden konnte. Die Gründe für diese Dissoziation sind zu klären. Es kann geschlussfolgert werden, dass KU14R im Gegensatz zur bisherigen Darstellung in der Literatur kein Antagonist von insulinsekretionssteigernden Imidazolin ist. Dementsprechend konnte das von einigen Autoren vertretene Konzept, Imidazoline würden ihre Wirkung über einen B-Zell-spezifischen Imidazolinrezeptor ( $I_3$ -Rezeptor) entfalten, nicht bestätigt werden. Hingegen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass es im distalen Bereich der Stimulus-Sekretions-Kopplung, der zur Insulinexocytose führt, eine Bindungsstelle gibt, die spezifisch Imidazoline, nicht aber Imidazole erkennt, während die Bindung an  $K_{ir}6.2$  nur eine geringe Spezifität aufweist.

3) Die Hemmung des Energiestoffwechsels isolierter B-Zellen durch 250  $\mu\text{M}$  Natriumcyanid führte, wahrscheinlich bedingt durch einen Abfall der zellulären ATP-Konzentration und einen Anstieg der zellulären ADP-Konzentration, zu einer Öffnung von  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanälen, die durch Imidazoline geschlossen worden waren. Es zeigte sich jedoch insofern ein Unterschied zwischen den Imidazolin, als dass die Wirkungen von Alinidin und Phentolamin im Bereich ihrer halbmaximal  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal-hemmenden Konzentration zu beeinflussen waren, wohingegen die Wirkung von Efaroxan auch bei einer nahezu maximal effektiven Konzentration durch Natriumcyanid aufgehoben werden konnte. Von anderen Autoren war die Meinung vertreten worden, dass die an  $\text{K}_{\text{ir}}6.2$  bewirkte Hemmung die funktionelle Kopplung zwischen  $\text{K}_{\text{ir}}6.2$  und der regulativen Untereinheit SUR1 aufhebe. Durch die vorliegenden Versuche wurde jedoch nachgewiesen, dass die Imidazolin-induzierte Hemmung der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität durch endogene Stoffwechselsignale der B-Zelle, die über SUR1 wirksam werden, zu beeinflussen ist. Dadurch wird möglicherweise auch der oszillatorische Charakter der Efaroxan-induzierten Depolarisationen erklärbar.

4) Da von einigen Imidazolin, wie auch von Sulfonylharnstoffen, eine Wirkung auf pankreatische A-Zellen berichtet wird, ist es methodisch wünschenswert, A- und B-Zellen innerhalb der intakten Pankreasinsel elektrophysiologisch messen zu können. Es wurde eine kürzlich vorgestellte Methode zur Herstellung von Agarose-stabilisierten Pankreasschnitten adaptiert und ein Messplatz für die elektrophysiologische Registrierung von Zellen in vitalen Gewebeschnitten eingerichtet. Die ersten Ergebnisse, die mit dieser neuartigen Methode erzielt wurden, zeigten, dass Efaroxan an B-Zellen im intakten Inselverband ebenfalls eine Depolarisation des Membranpotentials bewirkte. Eine solche sichere Zuordnung des Efaroxan Effekts zu B-Zellen in der intakten Insel kann durch Calcium-Messungen mit dem Indikator Fura2 nicht erreicht werden.

Obwohl die an isolierten B-Zellen erhobenen Befunde prinzipiell tauglich sind, die Wirkungen der meisten Imidazoline auf die Stimulus-Sekretions-Kopplung der Insulinsekretion zu erfassen, können die Eigenschaften von Substanzen wie KU14R, die trotz  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalblockade und Depolarisation des Membranpotentials isolierter B-Zellen keine Steigerung der Insulinsekretion isolierter Langerhans'scher Inseln bewirken, bisher nicht hinreichend erklärt werden. Daher ist die Entwicklung der neu etablierten Technik, elektrophysiologische Untersuchungen an Pankreasschnitten durchzuführen, sinnvoll und notwendig, um durch ihren Einsatz weitere Einblicke in den Ablauf der Stimulus-Sekretions-Kopplung zu gewinnen.

## 7 Literaturverzeichnis

- AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J (1999): Molecular biology of Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels. *Endocr Rev* 20: 102-135.
- AHREN B (1998): Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): A gut hormone of potential interest in the treatment of diabetes. *BioEssays* 20: 642-651.
- ALBERTI KG, ZIMMET PZ (1998): Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15:539-553.
- ÄMMÄLÄ C, ELIASSON L, BOKVIST K, LARSSON O, ASHCROFT FM, RORSMAN P (1993): Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 472:665-688.
- ANDREU E, SORIA B, SANCHEZ-ANDRES JV (1997): Oscillation of gap junction electrical coupling in the mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol* 498:753-761.
- ATLAS D, BURSTEIN Y (1984): Isolation and partial purification of a clonidine-displacing endogenous brain substance. *Eur J Biochem* 144: 287-293.
- ASHCROFT FM, RORSMAN P (1989): Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54: 87-143.
- ASHCROFT FM, GRIBBLE FM (1999): ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in health and disease. *Diabetologia* 42: 903-919.
- ASHCROFT SJ, RANDLE PJ (1968): Control of insulin release by glucose. *Proc R Soc Med* 61: 814-815.
- ATWATER I, MEARS D, ROJAS E (1996): Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. In: *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. hrsg. v LeRoith D, Taylor SI; Lippincott, Philadelphia; 79-102.
- BABENKO AP, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J (1998): A view of SUR/Kir6.X; K<sub>ATP</sub> channels. *Ann Rev Physiol* 60: 667-687.
- BARG S, GALVANOVSKIS J, GÖPEL SO, RORSMAN P, ELIASSON L (2000): Tight Coupling Between Electrical Activity and Exocytosis in Mouse Glucagon-Secreting  $\alpha$ -Cells. *Diabetes* 49: 1500-1510.
- BARG S (2003): Mechanisms of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagons-secretion A-cells. *Pharmacol Toxicol* 92: 3-13.
- BALL AJ, FLATT PR, MCCLENAGHAN NH (2000): Stimulation of Insulin Secretion in clonal BRIN-BD11 Cells by the Imidazolin Derivates KU14R and RX801080. *Pharmacol Res* 42: 575-579.

- BERGER W (1990): Rationale Grundlage der Insulintherapie. *Akt Endokr Stoffw* 11: 203-211.
- BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I (2004): Glucose-dependence of imidazoline-induced insulin secretion. *Diabetes* 53 (Suppl. 3): S135-S139.
- BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I (2005): The essential role of the imidazoline moiety in the insulinotropic effect but not  $K_{ATP}$  channel blocking effect of imidazolines; A comparison of the effects of efaroxan and its imidazole analogue, KU14R. *Diabetologia* in Press.
- BODEN G (1997): Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46: 3-10.
- BOULTON AJ (2000): The diabetic foot: a global view. *Diabetes Metab Res Rev* 16 (Suppl 1): S2-S5.
- BOUSQUET P, FELDMANN J, SCHWARTZ, J (1984): Central cardiovascular effects of  $\alpha$ -adrenergic drugs: Difference between catecholamines and imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther* 230: 230-236.
- BROWN CA, CHAN SL, STILLINGS MR, SMITH SA, MORGAN NG (1993): Antagonism of the stimulatory effects of efaroxan and glibenclamide in rat pancreatic islets by the imidazoline, RX801080. *Br J Pharmacol* 110(3): 1017-1022.
- BRYAN J, AGUILAR-BRYAN L (1999): Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Biochim Biophys Acta* 1461: 285-303.
- BYRNE MM, STURIS J, O'MEARA NM, POLONSKY KS (1996): Insulin secretion in Humans: Physiologic Regulation and Alteration in Disease States. In: *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. hrsg. v. LeRoith D, Taylor SI; Lippincott, Philadelphia, pp 3-11.
- CAHILL GF Jr (1988): Beta-cell deficiency, insulin resistance, or both? *N Engl J Med* 318(19): 1268-1270.
- CERASI E, LUFT R (1967): The Plasma Insulin response to glucose infusion in healthy subjects and in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol* 55: 278-304.
- CHAN SLF, MORGAN NG (1990): Stimulation of insulin secretion by efaroxan may involve interaction with potassium channels. *Eur J Pharmacol* 176: 97-101.
- CHAN SLF, DUNNE MJ, STILLINGS MR, MORGAN NG (1991): The  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist efaroxan modulates  $K^+_{ATP}$ -channels in insulin-secreting cells. *Eur J Pharmacol* 204: 41-48.
- CHAN SLF, BROWN CA, MORGAN NG (1993): Stimulation of insulin secretion by the imidazoline  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist efaroxan is mediated by a novel, stereoselective, binding site. *Eur J Pharmacol* 230: 375-378.

CHAN SLF, ATLAS D, JAMES RFL, MORGAN NG (1997): The effect of the putative endogenous imidazoline receptor ligand clonidine-displacing substance on insulin secretion from rat and human islets. *Br J Pharmacol* 112: 1065-1070.

CHAN SLF, PALLETT AL, CLEWS J, RAMSDEN CA, CHAPMAN JC, KANE C, DUNNE MJ, MORGAN NG (1998): Characterisation of new efaroxan derivates for use in purification of imidazoline-binding sites. *Eur J Pharmacol* 355: 67-76.

CHAN SLF, MOURTADA M, MORGAN NG (2001): Characterisation of a  $K_{ATP}$  channel-independent pathway involved in potentiation of insulin secretion by Efaroxan. *Diabetes* 50: 340-347.

COLQUHOUN D, SIGWORTH FJ (1995): Fitting and statistical analysis of single channel records. In: *Single Channel Recording*; hrsg. v. Sakmann B, Neher E; Plenum Press, New York, London: 499-501.

COOPER EJ, HUDSON AL, PARKER CA, MORGAN NG (2003): Effects of the beta-carbolines, harmaline and pinoline, on insulin secretion from isolated human islets of Langerhans. *Eur J Pharmacol* 482: 189-196.

COORE HG, RANDLE PJ (1964): Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro. *Biochem J* 93:66-78.

CREUTZFELDT W (2001): The entero-insular axis in type 2 diabetes – incretins as therapeutic agents. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 (Suppl. 2): S288-S303.

DAVIES MJ, RAYMAN G, GRENFELL A, GRAY IP, HALES CN (1993): Loss of first phase insulin response to intravenous glucose in subjects with persistent impaired glucose tolerance. *Diabet Med* 11: 432-436.

DE FRONZO RA, TOBIN JD, ANDRES R (1979): Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237: E214- E223.

DEL PRATO S, TIENGO A (2001): The Importance of first phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 17: 164-174.

DRUCKER DJ (2003): Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26: 2929-2940.

DUNNE MJ, HARDING EA, JAGGER JH, SQUIRES PE (1994): Ion channels and the molecular control of insulin secretion. *Biochem Soc Trans* 22: 6-12.

EFANOV AM, ZAITSEV SV, MEST HJ, RAAP A, APPELSKOG IE, LARSSON O, BERGGREN PO, EFENDIC S (2001a): The novel imidazoline compound BL11282 potentiates glucose-induced insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells in the absence of modulation of  $K_{ATP}$  channel activity. *Diabetes* 50: 797-802.

EFANOV AM, HØY M, BRÄNSTRÖM R, ZAITSEV S, MAGNUSON MA, EFENDIC S, GROMADA J, BERGGREN PO (2001b): The Imidazoline RX871024 stimulates insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells from mice deficient in  $K_{ATP}$  channel function. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 918-922.



- EFANOVA IB, ZAITSEV SV, EFANOV AM, OSTENSON C, RAAP A, MEST H, BERGGREN P, EFENDIC S (1998): Effects of the imidazoline derivate RX871024 on insulin, glucagon and somatostation secretion from isolated perfused rat pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 162-165.
- EFENDIC S, CERASI E, LUFT R (1975): Effect of Phentolamine and preperfusion with glucose on insulin release from the isolated perfused pancreas from fasted and fed rats. *Diabetologia* 11: 407-410.
- EFENDIC S, EFANOV AM, BERGGREN PO, ZAITSEV (2002): Two generations of insulintropic imidazoline compounds. *Diabetes* 51 (Suppl. 3): S448-454.
- EXPERT COMMITTEE (2003): Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 26 (Suppl. 1): S5-S20.
- FERANNINI E (1998): Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin- dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev* 19: 477-490.
- FUJITANI J, OKAZAKI K, YADA T (1997): The ability of a new hypoglycaemic agent, A4166; compared to sulphonylureas, to increase cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in pancreatic  $\beta$ -cells under metabolic inhibition. *Br J Pharmacol* 120: 1191-1198.
- GALLWITZ B, ROPETER T, MORYS-WORTMANN C, MENTLEIN R, SIEGEL EG, SCHMIDT WE (2000): GLP-1-analogues resistant to degradation by dipeptidyl-peptidase IV in vitro. *Regul Pept.* 86:103-111.
- GEMBAL M, GILON P, HENQUIN JC (1992): Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channels in mouse B-cells. *J Clin Invest* 89:1288-1295.
- GEORGE K, ALBERTI MM (2001): Treating type 2 diabetes - today's targets, tomorrow's goals. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 3 (Suppl. 1): S3-S10.
- GEPTS W, CHRISTOPHE J, MAYER J (1960): Pancreatic islets in mice with the obese-hyperglycemic syndrome. *Diabetes* 9: 63-69.
- GERICH JE (1998): The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 19: 491-503.
- GERMAN MS (1993): Glucose sensing in the pancreatic islets beta cells: The key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc Nat Acad Sci* 50: 1781-1785.
- GHOSH A, RONNER P, CHEONG E, KHALID P, MATSCHINSKY FM (1991): The role of ATP and free ADP in metabolic coupling during fuel-stimulated insulin release from islet beta-cells in the isolated perfused rat pancreas. *J Biol Chem* 266:22887-22892.
- GILON P, SHEPHERD RM, HENQUIN JC (1993): Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  as evidences in single pancreatic islets. *J Biol Chem* 268: 22265-22268.

- GÖPEL S, KANNO T, BARG S, GALVANOVSKIS J, RORSMAN P (1999): Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol* 521.3: 717—728.
- GÖPEL S, KANNO T, BARG S, WENG X, GROMADA J, RORSMAN P (2000): Regulation of glucagon release in mouse  $\alpha$ -cells by  $K_{ATP}$ -channels and inactivation of TTX-sensitive  $Na^+$  channels. *J Physiol* 528: 509-520.
- GÖPEL S, ZHANG Q, ELIASSON L, MA XS, GALVANOVSKIS J, KANNO T, SALEHI A, RORSMAN P (2004): Capacitance measurements of exocytosis in mouse pancreatic  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\delta$ -cells within intact islets of Langerhans. *J Physiol* 556:711-726.
- GOLDMAN WF, BLAUSTEIN MP (1988): Stimulation-induced regional alteration of  $Ca^{2+}$  levels in single arterial smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 12 (Suppl. 5): S13-19.
- GOTOH M, MAKI T, KIYOIZUMI T, SATOMI S, MONACO AP (1985): An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation* 40: 437-438.
- GRAHAM FL, SMILEY J, RUSSELL WC, NAIRN R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74.
- GRIBBLE FM, TUCKER SJ, ASHCROFT FM (1997): The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive  $K^+$  channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J Physiol* 504: 35-45.
- GRIBBLE F, DAVIS TME, HIGHAM C, CLARK A, ASHCROFT FM (2000): The antimalarial agent mefloquine inhibits ATP-sensitive K-channels. *Br J Pharmacol* 131: 756-760.
- GRODSKY GM (1996): Kinetics of insulin secretion: Current implications. In: *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. hrsg. v. LeRoith D, Taylor SI; Lippincott, Philadelphia, pp 12-20.
- GROSSE-LACKMANN T, ZÜNKLER BJ, RUSTENBECK I (2003): Specificity of nonadrenergic imidazoline binding sites in insulin-secreting cells and relation to the block of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Ann NY Acad Sci* 1009: 371-377.
- HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B, SIGWORTH FJ (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85–100.
- HÄRING HU, MATTHAEI S (2002): Diabetes mellitus Typ 2. *Diabetes und Stoffwechsel* 11 (Suppl. 2): 9-13.
- HAUNER H (1998): Verbreitung des Diabetes mellitus in Deutschland. *Dtsch Med Wschr* 123: 777-782.
- HELLER G, GUNSTER C, SCHELLSCHMIDT H (2004): Wie häufig sind Diabetes-bedingte Amputationen unterer Extremitäten in Deutschland? *Dtsch Med Wschr* 129: 429-433.

- HENQUIN JC, MEISSNER HP (1984): Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus secretion coupling in pancreatic B-cells. *Experientia* 40: 1043-1052.
- HENQUIN JC, GEMBAL M, DETIMARY P, GAO ZY, WARNOTTE C, GILON P (1994): Multisite control of insulin release by glucose. *Diabet Metab* 20:132-137.
- HENQUIN JC (1998): A minimum of fuel is necessary for tolbutamide to mimic the effects of glucose on electrical activity in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 139: 993-998.
- HENQUIN JC (2000): Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49: 1751-1760.
- HIRAOKA M (1997): Pathophysiological functions of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in myocardial ischemia. *Jpn Heart J* 38: 297-315.
- HOLST JJ, DEACON CF (1998): Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* 47: 1663-1670.
- HOLST JJ (2002): Therapy of type 2 diabetes based on the actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes Metab Res Rev* 18: 430-441.
- HOLZ GG, HABENER JF (1992): Signal transduction crosstalk in the endocrine system: pancreatic  $\beta$ -cells and the glucose competence concept. *Trends Biochem Sci* 17: 388-393.
- HORN R, MARTY A (1988): Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 92: 145-159.
- HØY M, HERVØR LO, ANDERSEN HS, BOKVIST K, BUSCHARD K, HANSEN J, JACOBSON P, PETERSEN JS, RORSMAN P, GROMADA J (2003): Imidazoline NNC77-0074 stimulates insulin secretion and inhibits glucagon release by control of Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells. *Eur J Pharmacol* 466: 213-221.
- HUDSON AL, PRICE RJ, TYACKE RJ, LALIES MD, PARKER CA, NUTT DJ (1999): Harmane, norharmane and tetrahydro  $\beta$ -carbolines have high affinity for rat imidazoline binding sites. (Abstract). *Br J Pharmacol* 126: 2P.
- IBBOTSON T, EDWARDS G, WESTON A (1993): Antagonism of levcromakalim by imidazoline- and guanidine-derivates in rat portal veinb: involvement of the delayed rectifier. *Br J Pharmacol* 110: 1556-1564.
- JANKA HU, REDAELLI M, GANDJOUR A, GIANI G, HAUNER H, MICHAELIS D, STANDL E. Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. In: *Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG*. hrsg. v. Scherbaum WA, Lauterbach KW, Renner R. 1. Auflage. Deutsche Diabetes-Gesellschaft 2000.
- JING X, LI DQ, OLOFSSON CS, SALEHI A, SURVE VV, CABALLERO J, IVARSSON R, LUNDQUIST I, PEREVERZEV A, SCHNEIDER T, RORSMAN P, RENSTRÖM E (2005): Ca<sub>v</sub>2.3 calcium channels control second phase insulin release. *J Clin Invest* 115: 146-154.

JONAS JC, GARCIA-BARRADO MJ, ANGEL I, HENQUIN JC (1994): The imidazoline SL 84.0418 shows stereoselectivity in blocking alpha 2-adrenoceptors but not ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Eur J Pharmacol* 264: 81-84.

KARAM JH, SANZ E, SALOMON E, NOLTE MS (1986): Selective unresponsiveness of pancreas β-cells to acute sulfonylurea stimulation during sulfonylurea therapy in NIDDM. *Diabetes* 35: 1314-1320.

KAWAKI J, NAGASHIMA K, TANAKA J, TAKASHI M, MIYAZAKI M, GONOI T, MITSUHASHI N, NAKAJIAMA N, IWANAGA T, YANO H, SEINO S (1999): Unresponsiveness to glibenclamide during chronic treatment induced by reduction of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Diabetes* 48: 2001-2006.

LACY PE, KOSTIANOVSKY M (1967): Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16: 35-39.

LERNMARK A (1974): The preparation of and studies on free cell suspensions from mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 10: 431-438.

LENZEN S (1979): Insulin secretion by isolated perfused rat and mouse pancreas. *Am J Physiol.* 236 (4): E391-E400.

LI G, REGUNATHAN S, BARROW CJ, ESHRAGI J, COOPER R, REIS DJ (1994): Agmatin: An endogenous clonidin-displacing substance in the brain. *Science* 263: 966-969.

LILLIOJA S, MOTT DM, SPRAUL M et al (1993): Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies in Pima Indians. *N Engl J Med* 329: 1988-1992.

MacDONALD PE, EL-KHOLY W, RIEDEL MJ, SALAPATEK AMF, LIGHT PE, WHEELER MB (2002a): The Multiple Actions of GLP-1 on the Process of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes*, Vol 51, Suppl. 3: S434-S442.

MacDONALD PE, SEWING S, WANG J, JOSEPH JW, SMUKLER SR, SAKELLAROPOULOS G, WANG J, SALEH MC, CHAN CB, TSUSHIMA RG, SALAPATEK AMF, WHEELER MB (2002b): Inhibition of Kv2.1 Voltage-dependent K<sup>+</sup> Channels in Pancreatic β-Cells Enhances Glucose-dependent Insulin Secretion. *J Biol Chem* Nov 22, 277 (47): 44938-44945.

MALAISSSE WJ, SENER A, HERCHUELZ A, HUTTON JC (1979): Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism* 28: 373-386.

MARTY A, NEHER E (1983): Tight-seal whole cell recording. *In* Single-Channel Recording. B.Sackmann and E. Neher, editors, Plenum Publishing Corp., New York, NY 107-122.

MATSCHINSKY FM (1996): A Lesson in Metabolic Regulation inspired by the Glucokinase Glucose Sensor Paradigm. *Diabetes* 45: 223-241.

MATTHAEI S, HAMANN A, KLEIN HH, BENECKE H, KREYMANN G, FLIER JS, GRETEN H (1992): Evidence that metformin increases insulin-stimulated glucose transport by potentiating insulin-induced translocation of glucose transporters from an intracellular pool to the cell surface in rat adipocytes. *Horm Metab Res Suppl* 26: 34-41.

- MATTHEWS EK (1970): Calcium and Hormone Release. In: *Calcium and Cellular function*, hrsg. v. AW Cuthbert, London, Macmillan: 163-182.
- MAYER G, TABERNER PV (2002): Effects of the imidazoline ligands efaroxan and KU14R on blood glucose homeostasis in the mouse. *Eur J Pharmacol* 454: 95-102.
- McCLENAGHAN NH, BARNETT CR, AH-SING E, ABDEL-WAHAB YH, O'HARTE FP, YOON TW, SWANSTON-FLATT SK, FLATT PR (1996): Characterisation of a novel glucose-responsive insulin-secreting cell line, BRIN-BD11, produced by electrofusion. *Diabetes* 45:1132-1140.
- MEARS D, SHEPPARD NF JR, ATWATER I, ROJAS E (1995): Magnitude and modulation of pancreatic beta-cell gap junction electrical conductance in situ. *J Membr Biol.* 146:163-176.
- MEDA P, BOSCO D, CHANSON M, GIORDANO E, VALLAR L, WOLLHEIM C, ORCI L (1990): Rapid and reversible secretion changes during uncoupling of rat insulin-producing cells. *J Clin Invest* 86: 759-768.
- MEGLASSON MD, NELSON J, NELSON D, ERECINSKA M (1989): Bioenergetic response of pancreatic islets to stimulation by fuel molecules. *Metabolism* 38: 1188-1195.
- MEIER JJ, GALLWITZ B, NAUCK MA (2003): Glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide: potential applications in type 2 diabetes mellitus. *BioDrugs* 17:93-102.
- MOLDERINGS, G.J. (1997): Imidazoline receptors: basic knowledge, recent advances and future prospects for therapy and diagnosis. *Drugs Future* 22: 757-772.
- MORGAN NG, PALLETT AL, MOURTADA M, CHAN SLF, CLEWS J, RAMSDEN CA (1996): Synthesis and characterisation of KU14R a novel antagonist of the pancreatic islet imidazoline binding site. *Diabetologia* 39 (Suppl. 1) (Abstract): A121.
- MORGAN NG (1999): Imidazoline receptors: new targets for antihyperglycaemic drugs. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 8: 575-584.
- MOSKALEWSKI S (1965): Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrin* 5: 342-353.
- MOURTADA M, SMITH SA, MORGAN NG (1997): Insulin secretagogues with an imidazoline structure inhibit arginine-induced secretion from isolated glucagon secretion from isolated rat islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 162-166.
- MUKAI E, ISHIDA H, HORIE M, NOMA A, SEINO Y, TAKANO M (1998a): The antiarrhythmic agent cibenzoline inhibits K<sub>ATP</sub> channels by binding to K<sub>ir</sub>6.2. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 477-481.
- MUKAI E, ISHIDA H, KATO S, TSUURA Y, FULIMOTO S, ISHIDA-TAKAHASHI A, HORIE M, TSUDA K, SEINO Y (1998b): Metabolic inhibition impairs ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel block by sulfonylurea in pancreatic  $\beta$ -cells. *Am J Physiol* 274: E38-E44.

- MUDALIAR S, HENRY RR (2001): New Oral Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus: The Glitazones or Insulin Sensitizers. *Annu Rev Med* 52: 239-257.
- NADAL A, QUESADA I, SORIA B (1999): Homologous and heterologous asynchronicity between identified  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\delta$ -cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol* 517.1: 85-93.
- NESHER R, CERASI E (1987): Biphasic insulin release as the expression of combined inhibitory and potentiating effects of glucose. *Endocrinology* 121: 1017-1024.
- NESHER R, CERASI E (2002): Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose. *Diabetes* 51 (Suppl 1): S53-59.
- NENQUIN M, SZOLLOSI A, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J, HENQUIN JC (2004): Both Triggering and Amplifying Pathways Contribute to Fuel-induced Insulin Secretion in the Absence of Sulfonylurea Receptor-1 in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *J Biol Chem* 279: 32316-32324.
- NEWGARD CB, MCGARRY JD (1995): Metabolic coupling factors in pancreatic  $\beta$ -cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 64: 689-719.
- NICHOLS CG, LOPATIN AN (1997): Inward Rectifier Potassium Channels. *Annu Rev Physiol* 59: 171-191.
- NIELSEN LL, YOUNG AA, PARKES DG (2004): Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes. *Regul Pept* 117: 77-88.
- NORMAN P, RABASEDA X (2001): Nateglinide: A structurally novel, short-acting, hypoglycemic agent. *Drugs Today* 37: 411-426.
- NUMBERGER M, DRAGUHN A (1996): In: *Patch-Clamp-Technik*, hrsg. v. Labor im Fokus, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996.
- PANTEN U, ISHIDA H, SCHAUDER P, FRERICHS H, HASSELBLATT A (1977): A versatile microperfusion system. *Anal Biochem* 82: 317-326.
- PANTEN U, SCHWANSTECHE M, WALLASCH A, LENZEN S (1988): Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 338: 459-462.
- PIPELEERS D, IN'T VELD PI, MAES E, VAN DE WINKEL M (1982): Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 7322-7325.
- PLANT TD, HENQUIN JC (1990): Phentolamine and yohimbine inhibit ATP-sensitive  $K^+$  channels in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Br J Pharmacol* 101: 115-120.
- PLANT TD, JONAS JC, HENQUIN JC (1991): Clonidine inhibits ATP-sensitive  $K^+$  channels in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Br J Pharmacol* 104: 385-390.

- PLANT TD, EILERS J, KONNERTH A (1995): Patch-Clamp Technique in Brain Slices. In *Patch-Clamp Applications and Protocols, Neuromethods 26* hrsg. v. BOULTON AA, BAKER GB, WALZ W, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- PRATLEY RE, HAGBERG JM, DENGEL DR, ROGUS EM, MULLER DC, GOLDBERG AP (2000): Aerobic exercise training-induced reductions in abdominal fat and glucose stimulated insulin responses in middle-aged and older men. *J Am Geriatr Soc* 48: 1055-1061.
- PRATLEY RE, WEYER C (2001): The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 44: 929-945.
- PRATLEY RE, FOLEY JE, DUNNING BE (2001): Rapid acting insulintropic agents: restoration of early insulin secretion as a physiologic approach to improve glucose control. *Curr Pharm Des* 7: 1375-1397.
- Praxis-Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG). Diabetes und Stoffwechsel, Band 11, Suppl. 2 (Mai 2002) hrsg. v. Werner A. Scherbaum und Rüdiger Landgraf.
- PRELL GD, MARTINELLI G, HOLSTEIN GR, MATULIC-ADAMIC J, WATANABE KA, CHAN SLF, MORGAN NG, HAXHIU MA, ERNSBERGER P (2004): Imidazolieacetic acid-ribotide: An endogenous ligand that stimulates imidazol(in)e receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13677-13682.
- PRENTKI M (1996): New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol* 134: 272-286.
- PROKS P, ASHCROFT FM (1997): Phentolamine block of  $K_{ATP}$  channels is mediated by  $K_{ir6.2}$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11716-11720.
- QUESADA I, FUENTES E, ANDREU E, MEDA P, NADAL A, SORIA B (2003): On-line analysis of gap junctions reveals more efficient electrical than dye coupling between islet cells. *Am J Physiol* 284: E980-E987.
- ROBERTSON RP, PORTE D (1973): Adrenergic modulation of basal insulin secretion in man. *Diabetes* 22: 1-8.
- ROE MW, WORLEY JF, MITTAL AA, KUZNETSOV A, DASGUPTA S, MERTZ RJ, WITHERSPOON SM, BLAIR N, LANCASTER ME, MCINTYRE MS, SHEHEE WR, DUKES ID, PHILIPSON LH (1996): Expression and Function of pancreatic  $\beta$ -Cell delayed rectifier  $K^+$  channels. *J Biol Chem* 271: 32241-32246.
- RORSMAN P, TRUBE G (1985): Glucose dependent  $K^+$  -channels in pancreatic  $\beta$ -cells are regulated by intracellular ATP, *Pflügers Arch* 405: 305-309.
- RORSMAN P, ASHCROFT FM, TRUBE G (1988): Single  $Ca^{2+}$  channel currents in mouse pancreatic B-cells. *Pflügers Arch* 412: 597-603.
- RUSTENBECK I, LEUPOLT L, KOWALEWSKI R, HASSELBLATT A (1999): Heterogeneous characteristics of imidazoline-induced insulin secretion. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 359: 235-242.

RUSTENBECK I, WINKLER M, JÖRNS A (2001a): Desensitization of insulin secretory response to imidazolines, tolbutamide, and quinine. I. Secretory and morphological studies. *Biochem Pharmacol* 62: 1685-1694.

RUSTENBECK I, DICKEL C, GRIMMSMANN T (2001b): Desensitization of insulin secretory response to imidazolines, tolbutamide, and quinine. II. Electrophysiological and fluorimetric studies. *Biochem Pharmacol* 62: 1695-1703.

RUSTENBECK I, FRICKE K, DICKEL C, GROSSE-LACKMANN T (2002): Antagonism of imidazolin-induced  $K_{ATP}$  channel block by diazoxide and nucleotides. *Diabetologia* 45, (Suppl.2) A167: 511.

RUSTENBECK I, WIENBERGEN A, BLECK C, JÖRNS A (2004a): Desensitization of insulin secretion by depolarizing insulin secretagogues. *Diabetes* 53 (Suppl 3): S140-S150.

RUSTENBECK I, KRAUTHEIM A, STEINFELDER HJ (2004b): Beta-cell toxicity of ATP-sensitive  $K^+$  channel blocking insulin secretagogues. *Biochem Pharmacol* 67: 1733-1741.

SAMOLS E, WEIR GC (1979): Adrenergic Modulation of Pancreatic A, B, and D Cells. *J Clin Invest* 63: 230–238.

SCHUIT FC, HUYPENS P, HEIMBERG H, PIPELEERS DG (2001): Glucose Sensing in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Diabetes* 50: 1-11.

SCHULZ A, HASSELBLATT A (1988): Phentolamine, a deceptive tool to investigate sympathetic nervous control of insulin release. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337: 637-643.

SCHULZ A, HASSELBLATT A (1989a): An insulin-releasing property of imidazoline derivatives is not limited to compounds that block  $\alpha$ -receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340: 321-327.

SCHULZ A, HASSELBLATT A (1989b): Dual action of clonidine on insulin release: Suppression, but stimulation when  $\alpha$ -receptors are blocked. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340: 712-714.

SCHWAPPACH B, ZERANGUE N, JAN YN, JAN LY (2000): Molecular basic for  $K_{ATP}$ -assembly: transmembrane interactions mediate association of a  $K^+$  channel with an ABC transporter. *Neuron* 26: 155-167.

SERRE-BEINIER V, LE GURUN S, BELLUARDO N, TROVATO-SALINARO A, CHAROLLAIS A, HAEFLIGER JA, CONDORELLI DF, MEDA P (2000): Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets. *Diabetes* 49: 727-734.

SHEPERD RM, HASHMI MN, KANE C, SQUIRES PE, DUNNE MJ (1996): Elevation of cytosolic calcium by imidazolines in mouse islets of Langerhans: implications for stimulus-response coupling of insulin release. *Br J Pharmacol* 119: 911-916.

SIGWORTH FJ (1986): EPC-7 User's Manual, List-Electronic, Darmstadt.



SINGH G, HUSSAIN JF, MACKINNON A, BROWN CM, KENDALL DA, WILLSON VG (1995): Evidence for the presence of a non-catecholamine, clonidine-displacing substance in crude, methanolic extracts of bovine brain and lung. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 351: 17-26.

SLOUGH S, GUILLAUMET G, TABERNER PV (2002): Evidence that the novel imidazoline compound FT005 is an  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist. *Br J Pharmacol* 136: 1049-1057.

SMITH P, ASHCROFT FM, RORSMAN P (1990): Simultaneous recordings of glucose dependent electrical activity and ATP-regulated  $K^+$ -currents in isolated mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *FEBS Lett* 261: 187-190.

SPEIER S, RUPNIK M (2003): A novel approach to in situ characterization of pancreatic  $\beta$ -cells. *Pflügers Arch* 446: 553-558.

SPEIER S (2004): In: *Electrophysiological characterisation of insulin secreting  $\beta$ -cells in pancreatic tissue slices*. PhD Thesis submitted at the Georg August University of Göttingen, Faculty of Biology.

SPEIER S, YANG SB, SROKA K, ROSE T, RUPNIK M (2005):  $K_{ATP}$ -channels in beta-cells in tissue slices are directly modulated by millimolar ATP. *Mol Cell Endocrinol* 230: 51-58.

SQUIRES PE, HILLS CE, ROGERS GJ, GARLAND P, FARLEY SR, MORGAN NG (2004): The putative imidazoline receptor agonist, harmaline, promotes intracellular calcium mobilisation in pancreatic beta-cells. *Eur J Pharmacol* 501: 31-39.

STUMVOLL M, HÄRING HU (2002): Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms. *Ann Med* 34: 217-224.

STRAUB SG, SHARP GWG (2002): Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18: 451-463.

THE AXON GUIDE for Electrophysiology and Biophysics Laboratory Techniques (1993), hrsg. v. SHERMAN-GOLD, R, Axon Instruments, Inc.

TRUBE G, RORSMAN P, OHNO-SHOSAKU T (1986): Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent  $K^+$ -channel in mouse pancreatic B-cell. *Pflügers Arch* 407: 493-499.

TUCKER SJ, GRIBBLE FM, ZHAO C, TRAPP S, ASHCROFT F (1997): Truncation of  $K_{ir}6.2$  produces ATP-sensitive  $K^+$ -channels in the absence of the sulfonylurea receptor. *Nature* 387: 179-183.

TURNER RC, HARRIS E, OUNSTED E, PONSFORD C (1979): Two abnormalities of glucose-induced insulin secretion: Dose response characteristics and insulin sensitivity. *Acta Endocrinol* 92: 148-165.

TURNER RC, CULL CA, FRIGHI V, HOLMAN RR (1999): Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49) *J Am Med Ass* 281: 2005-2012.

- TYLER DD (1992): The Mitochondrion in Health and Disease. VCH Weinheim/ New York
- VILSBØLL T, HOLST JJ (2004): Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 47: 357-366.
- WALZ W (1995): Perforated Patch-Clamp Technique. In *Patch-Clamp Applications and Protocols, Neuromethods* 26 hrsg. v. BOULTON AA, BAKER GB, WALZ W, Humana Press, Totowa, New Jersey, pp: 155-171.
- WEYER C, TATARANNI PA, BOGARDUS C, PRATLEY RE (2001): Insulin resistance and insulin secretory dysfunction are independent predictors of worsening of glucose tolerance during each stage of type 2 diabetes development. *Diabetes Care* 24: 89–94.
- WIEDEMAN PE, TREVILLYAN JM (2003): Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Curr Opin Investig Drugs* 4: 412-420.
- WOLLEN N, BAILEY CJ (1988 a): Metformin potentiates the antigluconeogenic action of insulin. *Diabete Metab* 14: 88-91.
- WOLLEN N, BAILEY CJ (1988 b): Inhibition of hepatic gluconeogenesis by metformin. Synergism with insulin. *Biochem Pharmacol* 37: 4353-4358.
- YANG SN, BERGGREN PO (2005):  $\text{Ca}_v2.3$  calcium channel and  $\text{PKC}\lambda$ : new players in insulin secretion. *J Clin Invest* 115: 16-20.
- YOUNG AA, GEDULIN BR, BHAVSAR S, BODKIN N, JODKA C, HANSEN B, DENARO M (1999): Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Diabetes* 48: 1026-1034.
- ZAITSEV SV, EFENDIC S, ARKHAMMAR P, BERTORELLO AM, BERGGREN PO (1995): Dissociation between changes in cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and insulin secretion as evidenced from measurements in mouse single pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci* 92: 9712-9718.
- ZAITSEV SV, EFANOV AM, EFANOVA IB, LARSSON O, ÖSTENSON CG, GOLD G, BERGGREN PO, EFENDIC S (1996): Imidazoline compounds stimulate insulin release by inhibition of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels and interaction with the exocytotic machinery. *Diabetes* 45: 1610-1618.
- ZIMMET P, ALBERTI KGMM, SHAW J (2001): Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787.
- ZIMNY S, GOGOLIN F, ABEL J, GLEICHMANN H (1993): Metallothionein in isolated pancreatic islets of mice: induction by zinc and streptozotocin, a naturally occurring diabetogen. *Arch Toxicol* 67: 61-65.

## 8 Abkürzungen

$\mu\text{l}$  = Mikroliter ( $10^{-6}$  l)

$\mu\text{M}$  =  $10^{-6}$  mol/l (mikromolar)

A = Ampere

ADA = American Diabetes Association

Aqua bidest. = zweifach destilliertes Leitungswasser

bzw. = beziehungsweise

cAMP = cyclisches Adenosin-mono-phosphat

CC = current-clamp

CDS = Clonidin-displacing Substances

$D_a$  = Aussendurchmesser

$D_i$  = Innendurchmesser

d.h. = das heißt

DMSO = Dimethylsulfoxid

DPP IV = Dipeptidyl peptidase IV

EGTA = Ethylenglykol-bis-( $\beta$ -amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

EZ = extrazelluläre Lösung

Fa. = Firma

FCS = fötales Kälberserum

HEPES = [4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure

$K_{ATP}$ -Kanäle = ATP-sensitive Kaliumkanäle

kDa =  $10^3$  Dalton

mM =  $10^{-3}$  mol/l (millimolar)

$M_r$  = relative Molekülmasse

N = Normal

NMRI = Naval medical research institute (USA)

PKA = Proteinkinase A

s = Sekunden

SUR1 = Sulfonylharnstoff-Receptor Typ 1

u.a. = unter anderem

v.a. = vor allem

VC = Voltage Clamp

z.B. = zum Beispiel

z.T. = zum Teil